



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 306 670**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00971184 .7**
(86) Fecha de presentación : **20.10.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1227837**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

(54) Título: **Procedimiento de inducción y/o intensificación de la respuesta inmunitaria frente a antígenos tumorales.**

(30) Prioridad: **22.10.1999 US 160879 P**
07.08.2000 US 223325 P

(73) Titular/es: **Sanofi Pasteur Limited**
1755 Steeles Avenue West
Toronto, Ontario M2R 3T4, CA

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

(72) Inventor/es: **Berinstein, Neil;**
Tartaglia, James;
Moingeon, Philippe y
Barber, Brian

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 306 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de inducción y/o intensificación de la respuesta inmunitaria frente a antígenos tumorales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para inducir y/o intensificar respuestas inmunitarias frente a antígenos tumorales.

10 **Antecedentes de la invención**

La utilización de enfoques inmunológicos ha resultado difícil debido a que las células tumorales son autoderivadas y por lo tanto no resultan tan inmunogénicas como los agentes exógenos, tales como bacterias y virus. Como resultado, el futuro de la inmunoterapia del cáncer se basa en la identificación de antígenos asociados a tumor ("TAA") que pueden resultar reconocidos por el sistema inmunológico. Específicamente, los antígenos diana que inducen respuestas mediadas por células T resultan de interés crítico. Lo expuesto anteriormente deriva de la evidencia de que los linfocitos T citotóxicos (CTLs) pueden inducir la regresión de tumores tanto en modelos animales (Kast, W. *et al.*, Cell 59:6035, 1989; Greendberg, P., Adv. Immunol. 49:281, 1991) como en el ser humano (Boon, T. *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12:337, 1994). Hasta hoy, se han identificado muchos antígenos asociados a tumor. Entre estos, se incluyen los antígenos MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, gp100, MART-1/Melan-A, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), así como muchos otros (Horig y Kaufman, Clinical Immunology 92:211-223, 1999). Algunos de estos antígenos asociados a tumor se comentan posteriormente.

El primer antígeno humano asociado a tumor que fue caracterizado se identificó que procedía de un melanoma. Este antígeno (denominado originalmente MAGE 1) se identificó utilizando CTLs aislados de un paciente de melanoma HLA A1+ para cribar células diana HLA A1 transfectadas con ADN tumoral (van der Bruggen, P., Science 254:1643, 1991; estos antígenos asociados a tumor en la actualidad se denominan MAGE-A1, MAGE-A2, etc.). Resulta interesante que MAGE 1 se descubrió que pertenecía a una familia de por lo menos 12 genes estrechamente relacionados situados en el cromosoma X (de Plaen, E. *et al.*, Immunogenetics 40:360, 1994). La secuencia de ácidos nucleicos de los 11 genes MAGE adicionales comparte 65% a 85% de identidad con la de MAGE-1 (de Smet, C. *et al.*, Immunogenetics 39:121, 1994). Tanto MAGE-1 como MAGE-3 se encuentran presentes en tejidos normales, pero se expresan únicamente en los testículos (de Plaen, E. *et al.*, *supra*, 1994; de Smet, C. *et al.*, *supra*, 1994; Takahashi, K. *et al.*, Cancer Res. 55:3478, 1995; Chyomey, P. *et al.*, Immunogenetics 43:97, 1995). Estos resultados iniciales posteriormente se han extendido con la identificación de nuevas familias de genes (es decir, RAGE, BAGE, GAGE), la totalidad de las cuales típicamente no se expresan en tejidos normales (excepto los testículos), aunque se expresan en una diversidad de tipos tumorales.

El antígeno carcinoembrionario humano (CEA) es una glucoproteína de 180 kD expresada en la mayoría de los tumores de colon, rectales, de estómago y pancreáticos (Muaro *et al.*, Cancer Res. 45:5769, 1985), 50% de los carcinomas mamarios (Steward *et al.*, Cancer 33:1246, 1974) y 70% de los carcinomas pulmonares (Vincent, R.G. y Chu, T.M., J. Thor. Cardiovas. Surg. 66:320, 1978). El CEA inicialmente se describió como antígeno fetal específico de cáncer en el adenocarcinoma del tracto digestivo humano en 1965 (Gold, P. y Freeman, S.O., Exp. Med. 121:439, 1965). Desde ese momento, se ha caracterizado el CEA como un antígeno de superficie celular producido en exceso en prácticamente la totalidad de los tumores sólidos del tracto gastrointestinal humano. El gen de la proteína CEA humana ha sido clonado (Oikawa *et al.*, Biochim. Biophys. Res. 142:511-518, 1987; solicitud de patente europea nº EP 0346710). El CEA también se expresa en tejido digestivo fetal y en menor grado en epitelio normal de colon. La inmunogenicidad del CEA ha sido ambigua: algunos estudios han informado de la presencia de anticuerpos anti-CEA en pacientes (Gold *et al.*, Nature New Biology 239:60, 1973; Pompecki, R., Eur. J. Cancer 16:973, 1980; Ura *et al.*, Cancer Lett. 25:283, 1985; Fuchs *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 26:180, 1988), mientras que otros estudios no (LoGerfo *et al.*, Int. J. Cancer 9:344, 1972; MacSween, J.M., Int. J. Cancer 15:246, 1975; Chester, K.A. y Begent, H.J., Clin. Exp. Immunol. 58:685, 1984).

Se encuentra Gp100 normalmente en melanosomas y se expresa en melanocitos, células retinianas y otros derivados de la cresta neural. En la actualidad se desconoce cuál es la función de gp100. Mediante espectrometría de masas se han identificado tres epítomos gp100 inmunodominantes que se unen a HLA-A2: g9-154 (aminoácidos 154 a 162), g9-209 (aminoácidos 209 a 217) y g9-280 (aminoácidos 280 a 288). Notablemente dos de dichos epítomos (como péptidos) han sido alterados sintéticamente de manera que induzcan una respuesta inmunitaria más vigorosa en el clon original de células T: la treonina en la posición 2 en gp209 se sustituyó por metionina, y el residuo alanina en la posición 9 en gp-280 se sustituyó por valina. Estos cambios incrementaron la afinidad de unión de los péptidos epítomo a la molécula HLA-A2 sin modificar los epítomos naturales intrínsecos reconocidos por el receptor de células T (TCR). Rosenberg y colaboradores (NIH) ya han inmunizado con éxito pacientes de melanoma con uno de dichos péptidos modificados y han informado de respuestas clínicas objetivas en algunos pacientes.

Anteriormente se ha demostrado que el cáncer y las células dendríticas inducen una respuesta inmunitaria cuando se administran en los nódulos linfáticos (ver, por ejemplo, Proc. AACR 27:325, 1986; patente WO nº 97/47271; Nature Medicine 4:328-332, 1999, y Cancer Research 59:2536-2540, 1999).

A pesar de los avances significativos realizados con respecto a los enfoques inmunológicos en el tratamiento del cáncer, todavía existe una necesidad en la técnica de mejorar las inmunoterapias del cáncer.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para inducir y/o intensificar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno tumoral.

Los presentes inventores han descubierto que la administración de antígeno tumoral o ácido nucleico codificante del mismo directamente en un sitio linfático (tal como un nódulo linfático) induce y/o intensifica significativamente la respuesta inmunitaria frente al antígeno tumoral y/o rompe la tolerancia frente al antígeno tumoral, siendo ambos un reto importante en los procedimientos anteriores de la inmunoterapia del cáncer.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un aspecto de la presente invención proporciona la utilización de una cantidad eficaz de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un antígeno tumoral para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un animal frente a un antígeno tumoral, en la que el medicamento se administra en un sitio linfático en el animal.

Resultarán evidentes otras características y ventajas de la presente invención a partir de la descripción detallada siguiente. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican formas de realización preferidas de la invención, se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describe la invención en relación a los dibujos, en los que:

la figura 1 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de un análisis de IFN- γ -ELISPOT de un animal que recibe una inyección intranodal del antígeno tumoral.

La figura 2 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de un análisis de IFN- γ -ELISPOT de un animal que recibe una inyección intranodal del antígeno tumoral.

La figura 3 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de un análisis de IFN- γ -ELISPOT de un animal que recibe una inyección subcutánea del antígeno tumoral.

La figura 4 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de un análisis de IFN- γ -ELISPOT de un animal que ha recibido una inyección subcutánea del antígeno tumoral.

La figura 5 es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos tras un régimen de administración intranodal (grupo 2) y subcutánea (grupo 3) de péptidos inmunógenos gp100 modificados con ALVAC/gp100 modificados.

La figura 6 es la secuencia de ácidos nucleicos de un ADNc de gp100M (SEC ID n° 109).

La figura 7 es la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína gp100M modificada (SEC ID n° 110).

La figura 8 es la secuencia de ácidos nucleicos y de aminoácidos de un CEA modificado (SEC ID n° 111 y 112).

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente invención, la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para inducir y/o intensificar la respuesta inmunitaria frente a un antígeno tumoral. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la presente invención describe un procedimiento para inducir y/o intensificar una respuesta inmunitaria en un animal frente a un antígeno tumoral, que comprende administrar una cantidad eficaz de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno tumoral, un vector o una célula que comprende la secuencia de ácidos nucleicos, o una vacuna que comprende el antígeno tumoral, codificando la secuencia de ácidos nucleicos el antígeno tumoral, o un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que comprende el antígeno tumoral en un sitio linfático en el animal.

La expresión “inducir y/o intensificar una respuesta inmunitaria” se refiere a que el procedimiento induce y/o intensifica cualquier respuesta del sistema inmunológico del animal.

La expresión “respuesta inmunitaria” se define como cualquier respuesta del sistema inmunológico, por ejemplo de naturaleza mediada por células (es decir, mediada por linfocitos T citotóxicos) o de naturaleza humoral. Estas respuestas inmunitarias pueden evaluarse mediante varios ensayos *in vivo* o *in vitro* bien conocidas por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, ensayos de anticuerpos (por ejemplo ensayos ELISA), ensayos de citotoxicidad específicos de antígeno, producción de citoquinas (por ejemplo ensayos ELISPOT), regresión de tumores que expresan los antígenos tumorales, inhibición de células cancerosas que expresan los antígenos tumorales, etc.

La expresión “sitio linfático” se refiere a un sitio en el cuerpo que se encuentra asociado al sistema linfático, incluyendo órganos, tejidos, células, nódulos o glándulas linfáticos, tales como bazo, timo, amígdalas, placas de Peyer, médula ósea, linfocitos, conducto torácico, así como la totalidad de los nódulos linfáticos del cuerpo.

El término “animal” tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal y preferentemente es el ser humano.

La expresión “cantidad eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir los resultados deseados.

La expresión “antígeno tumoral” tal como se utiliza en la presente memoria incluye tanto antígenos asociados a tumor (TAAs) como antígenos específicos de tumor (TSAs). Un antígeno asociado a tumor se refiere a un antígeno que se expresa en la superficie de una célula tumoral en cantidad superiores a las observadas en células normales, o un antígeno que se expresa sobre células normales durante el desarrollo fetal. Un antígeno específico de tumor es un antígeno exclusivo de las células tumorales y que no se expresa en células normales. La expresión antígeno tumoral incluye TAAs o TSAs que ya han sido identificados y aquellos que todavía no han sido identificados, e incluye fragmentos, epítomos y cualquiera y todas las modificaciones de los antígenos tumorales.

El antígeno asociado a tumor puede ser cualquier antígeno asociado a tumor incluyendo, aunque sin limitación, gp100 (Kawakami *et al.*, J. Immunol. 154:3961-3968, 1995; Cox *et al.*, Science 264:716-719, 1994), MART-1/Melan A (Kawakami *et al.*, J. Exp. Med. 180:347-352, 1994; Castelli *et al.*, J. Exp. Med. 181:363-368, 1995), gp75 (TRP-1) (Wang *et al.*, J. Exp. Med. 186:1131-1140, 1996), y tirosinasa (Wolfel *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:759-764, 1994; Topalian *et al.*, J. Exp. Med. 183:1965-1971, 1996), proteoglicano de melanoma (Hellstrom *et al.*, J. Immunol. 130:1467-1, 1983; Ross *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 225:370-383, 1983); antígenos ampliamente compartidos específicos de tumor, por ejemplo antígenos de la familia MAGE, por ejemplo MAGE-1, 2, 3, 4, 6 y 12 (van der Bruggen *et al.*, Science 254:1643-1647, 1991); Rogner *et al.*, Genomics 29:729-731, 1995); antígenos de la familia BAGE (Boel *et al.*, Immunity 2:167-175, 1995); antígenos de la familia GAGE, por ejemplo GAGE-1,2 (van den Eynde *et al.*, J. Exp. Med. 182:689-698, 1995), antígenos de la familia RAGE, por ejemplo RAGE-1 (Gaugler *et al.*, Immunogenetics 44:323-330, 1996); N-acetilglucosaminiltransferasa V (Guilloux *et al.*, J. Exp. Med. 183:1173-1183, 1996) y p15 (Robbins *et al.*, J. Immunol. 154:5944-5950, 1995); antígenos mutados específicos de tumor; β -catenina mutada (Robbins *et al.*, J. Exp. Med. 183:1185-1192, 1996), MUM-1 mutado (Coulie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7976-7980, 1995) y quinasa-4 dependiente de ciclina (CDK4) mutada (Wolfel *et al.*, Science 269:1281-1284, 1995), productos oncogénicos mutados: p21 ras (Fossum *et al.*, Int. J. Cancer 56:40-45, 1994), BCR-abl (Bocchia *et al.*, Blood 85:2680-2684, 1995), p53 (Theobald *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11993-11997, 1995) y p185 HER2/neu (Fisk *et al.*, J. Exp. Med. 181:2109-2117, 1995; Peoples *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:432-436, 1995), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutado (Fujimoto *et al.*, Eur. J. Gynecol. Oncol. 16:40-47, 1995; Harris *et al.*, Breast Cancer Res. Treat. 29:1-2, 1994); antígenos carcinoembrionarios (CEA) (Kwong *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 85:982-990, 1995); mucinas mutadas asociadas a carcinoma, por ejemplo productos del gen MUC-1 (Jerome *et al.*, J. Immunol. 151:1654-1662, 1993; Ioannides *et al.*, J. Immunol. 151:3693-3703, 1993; Takahashi *et al.*, J. Immunol. 153:2102-2109, 1994); productos del gen EBNA del EBV, por ejemplo el producto del gen EBNA-1 (Rickinson *et al.*, Cancer Surveys 13:53-80, 1992); proteínas E7, E6 del papilomavirus humano (Ressing *et al.*, J. Immunol. 154:5934-5943, 1995); antígenos específicos de la próstata (PSA) (Xue *et al.*, The Prostate 30:73-78, 1997); antígeno membranal específico de la próstata (PSMA) (Israeli *et al.*, Cancer Res. 54:1807-1811, 1994); PCTA-1 (Sue *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252-7257, 1996); epítomos o antígenos idiotípicos, por ejemplo idiotipos de inmunoglobulina o idiotipos de receptor de células T (Chen *et al.*, J. Immunol. 153:4775-4787, 1994; Syrengelas *et al.*, Nat. Med. 2:1038-1040, 1996); KSA (patente US n° 5348887); NY-ESO-1 (patente WO n° 98/14464).

También se encuentran incluidos antígenos tumorales modificados y/o epítomos/péptidos derivados de los mismos (tanto no modificados como modificados). Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, epítomos/péptidos modificados y no modificados derivados de gp100 (patentes WO n° 98/02598, n° 95/29193, n° 97/34613, n° 98/33810); CEA (patente WO n° 99/19478; S. Zaremba *et al.*, Cancer Research 57:4570-7, 1997; K.T. Tsang *et al.*, J. Int. Cancer Inst. 87:982-90, 1995); MART-1 (patentes WO n° 98/58951, n° 98/02538; D. Valmeri *et al.*, J. Immunol. 164:1125-31, 2000); p53 (M. Eura *et al.*, Clinical Cancer Research 6:979-86, 2000), TRP-1 y TRP-2 (patente WO n° 97/29195), tirosinasa (patentes WO n° 96/21734, n° 97/11669, n° 97/34613, n° 98/33810, n° 95/23234, n° 97/26535); KSA (patente WO n° 97/15597); PSA (patente WO n° 96/40754); NY-ESO 1 (patente WO n° 99/18206); HER2/neu (patente US n° 5869445) y aquellos relacionados con la familia MAGE (L. Heidecker *et al.*, J. Immunol. 164:6045-5, 2000; patentes WO n° 95/04542, n° 95/25530, n° 95/25739, n° 96/26214, n° 97/31017, n° 98/10780).

En una forma de realización preferida, el antígeno asociado a tumor es gp100, un gp100 modificado o un fragmento del mismo. En particular, los inventores han preparado un péptido gp100 modificado denominado gp100M que presenta la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la figura 6 (SEC ID n° 109) y la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la figura 7 (SEC ID n° 110). Los inventores han demostrado que la inyección intranodal de un virus avipox recombinante que comprende un ácido nucleico codificante de fragmentos de gp100 modificado (que comprende los epítomos modificados 209(2M) (IMDQVPFSY, SEC ID n° 1) y 290(9V) (YLEPGPVTV, SEC ID n° 2) seguido epítomo/epítomo modificado, refuerza la respuesta inducida tanto humoral como mediada por células de manera que resulta varias veces superior a la respuesta cuando se administran los mismos antígenos subcutáneamente. Se comentan los detalles y resultados experimentales en el Ejemplo 1.

En otra forma de realización, el antígeno asociado a tumor es el antígeno carcinoembrionario (CEA), un CEA modificado o un fragmento del mismo. La secuencia de ácidos nucleicos de un antígeno CEA modificado se muestra en la figura 8 y en la SEC ID n° 111. La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en la figura 8 y en la SEC ID n° 112. Preferentemente, el antígeno CEA modificado comprende la secuencia YLSGADLNL, SEC ID n° 113.

Las formas de realización adicionales de la invención comprenden secuencias de ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican los antígenos tumorales y fragmentos o formas modificadas de los mismos tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. La secuencia "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a una secuencia de monómeros nucleótidos o nucleósidos que consiste de bases, azúcares y enlaces intersacáridos (esqueléticos) naturales. La expresión también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros no naturales o partes de los mismos con función similar. Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser ácidos ribonucleicos (ARN) o desoxirribonucleicos (ADN) y pueden contener bases naturales, incluyendo adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas, tales como xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras alquil-adeninas, 5-halo-uracilo, 5-halo-citosina, 6-aza-uracilo, 6-aza-citosina y 6-aza-timina, pseudouracilo, 4-tiouracilo, 8-halo-adenina, 8-amino-adenina, 8-tiol-adenina, 8-tiol-alquil-adeninas, 8-hidroxil-adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo-guaninas, 8-amino-guanina, 8-tiol-guanina, 8-tioalquil-guaninas, 8-hidroxil-guanina y otras guaninas 8-sustituidas, otros aza-uracilos y deaza-uracilos, timidinas, citosinas, adeninas o guaninas, 5-trifluorometil-uracilo y 5-trifluoro-citosina.

Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los antígenos tumorales de la invención incluyen, aunque sin limitación, ácido o ácidos nucleicos víricos, plásmido o plásmidos, ADN bacteriano, ADN y ARN desnudo/libre. Los ácidos nucleicos incluyen formas tanto de cadena única como doble. Como tales, estos ácidos nucleicos comprenden las secuencias de bases relevantes codificantes de los antígenos tumorales anteriormente indicados. Con fines de particularización, la expresión "secuencias de bases relevantes codificantes de los polipéptidos anteriormente indicados" comprende además las secuencias de ácidos nucleicos complementarias. Como tales, las formas de realización de la invención comprenden secuencias de ácidos nucleicos codificantes *per se* de los antígenos tumorales anteriormente indicados, o ácidos nucleicos recombinantes en los que se han insertado dichos ácidos nucleicos codificantes de antígenos tumorales (tal como se describe posteriormente).

El ADN bacteriano útil en las formas de realización de ácido nucleico recombinante de la invención es conocido para el experto ordinario en la materia. Entre las fuentes de ADN bacteriano se incluye, por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus*, bacilo de Calmette-Guérin (BCG), y *Streptococcus*. En las formas de realización de ADN bacteriano de la invención, puede insertarse ácido nucleico de la invención en el genoma bacteriano, puede permanecer en un estado libre o puede ser transportado en un plásmido.

Pueden derivarse formas de realización de ácido nucleico recombinante vírico de la invención a partir de un poxvirus u otro virus, tal como adenovirus o alfavirus. Preferentemente, el ácido nucleico vírico no es capaz de integrarse en células animales receptoras. Los elementos para la expresión a partir de dicho ácido nucleico pueden incluir un promotor adecuado para la expresión en células animales receptoras.

Las formas de realización de ácidos nucleicos recombinantes víricos específicos de la invención incluyen (aunque sin limitación) ácidos nucleicos de poxvirus, alfavirus y adenovirus. El ácido nucleico poxvírico puede seleccionarse de entre el grupo constituido por ácido nucleico avipox, ortopox y suipox. Entre las formas de realización particulares se incluyen ácido nucleico de poxvirus seleccionado de entre virus Vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario y viruela porcina; entre los ejemplos específicos se incluyen TROVAC, NYVAC, ALVAC, MVA, Wyeth y Poxvac-TC (descrito en más detalle posteriormente).

Se contempla además que los ácidos nucleicos recombinantes de la presente invención puedan incluir adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos codificantes de por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo constituido por citoquinas, linfoquinas y moléculas coestimuladoras. Entre los ejemplos se incluyen (aunque sin limitación) interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 6, interferón gamma, factor alfa de necrosis tumoral, GM-CSF, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3 y Cd72.

Pueden utilizarse técnicas estándares de biología molecular para la preparación y purificación de ácidos nucleicos bien conocidos por los expertos en la materia, para preparar los aspectos de ácido nucleico recombinante de la invención (por ejemplo tal como se enseña en Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.* (editores), John Wiley and Sons, Inc., N.Y., U.S.A., 1998, capítulos 1, 2 y 4; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a edición), J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis (editores), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A., 1989, capítulos 1, 2, 3 y 7).

Algunos aspectos de la presente invención incluyen además vectores que comprenden los ácidos nucleicos anteriormente indicados. En determinadas formas de realización, dichos vectores pueden ser virus o bacterias recombinantes (tal como se describe posteriormente).

Se han descrito vectores adenovirus y procedimientos para la construcción de los mismos (por ejemplo las patentes US n° 5994132, n° 5932210, n° 6057158 y las solicitudes de patentes PCT publicadas WO n° 9811783, n° 9744475, n° 9961034, n° 9950292, n° 9927101, n° 9720575, n° 9640955, n° 9630534, la totalidad de las cuales se incorporan en la

presente memoria como referencia). Asimismo, se han descrito en la técnica vectores alfavirus y pueden utilizarse en formas de realización de la presente invención (por ejemplo en las patentes US nº 5792462, nº 5739026, nº 5843723, nº 5789245 y en las solicitudes de patentes PCT publicadas WO nº 9210578, nº 9527044, nº 9531565, nº 9815636, la totalidad de las cuales se incorporan como referencia en la presente memoria), al igual que vectores lentivirus (por ejemplo en las patentes US nº 6013516, nº 5994136 y solicitudes de patente PCT publicada WO nº 9817816, nº 9712622, nº 9817815, nº 9839463, nº 9846083, nº 9915641, nº 9919501, nº 9930742, nº 9931251, nº 9851810 y nº 0000600, la totalidad de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria). Entre los vectores poxvirus que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, los poxvirus avipox, ortopox o suipox (tal como se describe en las patentes US nº 5364773, nº 4603112, nº 5762938, nº 5378457, nº 5494807, nº 5505941, nº 5756103, nº 5833975 y nº 5990091, la totalidad de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria). Los vectores poxvirus que comprenden un ácido nucleico codificante de un antígeno tumoral pueden obtenerse mediante recombinación homóloga, tal como es conocido por el experto ordinario en la materia. Como tales, el ácido nucleico codificante del antígeno tumoral se inserta en el genoma vírico bajo condiciones apropiadas para la expresión en células de mamífero (tal como se describe posteriormente).

En una forma de realización de la invención, el vector poxvirus es ALVAC (1) o ALVAC (2) (ambos derivados del virus de la viruela del canario). ALVAC (1) (o ALVAC (2) no se replican productivamente en huéspedes no aviares, una característica que se cree mejora su perfil de seguridad). ALVAC (1) es un vector basado en el virus de la viruela del canario atenuado que es un derivado clonado en placa de la vacuna autorizada de la viruela del canario Kanapox (Tartaglia *et al.*, Virology 188:217, 1992; patentes US nº 5505941, nº 5756103 y nº 5833975, la totalidad de las cuales se incorporan como referencia en la presente memoria). ALVAC (1) presenta algunas propiedades generales que son iguales a algunas propiedades generales del Kanapox. Los virus recombinantes basados en ALVAC que expresan inmunógenos extrínsecos también han demostrado resultar eficaces como vectores de vacuna (Tartaglia *et al.*, en: AIDS Research Reviews (vol. 3), Koff W., Wong-Staal, F. y Kenedy, R.C. (editores), Marcel Dekker, N.Y., páginas 361 a 378 (1993a); Tartaglia, J. *et al.*, J. Virol. 67:2370, 1993b). Por ejemplo, los ratones inmunizados con un recombinante de ALVAC (1) que expresaba la glucoproteína del virus de la rabia resultaron protegidos frente al reto letal con virus de la rabia (Tartaglia, J. *et al.*, *supra*, 1992), demostrando el potencial de ALVAC (1) como vector de vacuna. Los recombinantes basados en ALVAC también han demostrado resultar eficaces en perros retados con virus del distemper canino (Taylor, J. *et al.*, Virology 187:321, 1992) y con el virus de la rabia (Perkus, M.E. *et al.*, en: Combined Vaccines and Simultaneous Administration: Current Issues and Perspective, Annals of the New York Academy of Sciences, 1994), en gatos retados con virus de la leucemia felina (Tartaglia, J. *et al.*, *supra*, 1993b) y en caballos retados con el virus de la influenza equina (Taylor, J. *et al.*, en: Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza, Univ. of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, páginas 331 a 335, 1993).

ALVAC (2) es un vector ALVAC de segunda generación en el que los elementos de transcripción de Vaccinia E3L y K3L han sido insertados dentro del locus C6 (patente US nº 5990091, incorporada en la presente memoria como referencia). El elemento E3L codifica una proteína capaz de unirse específicamente a ARNdc. El ORF de K3L presenta homología significativa con E1F-2. Dentro de ALVAC (2), el gen E3L se encuentra bajo el control transcripcional del promotor natural del mismo, mientras que K3L se ha situado bajo control del promotor H6 temprano/tardío de virus Vaccinia. Los genes E3L y K3L actúan inhibiendo la actividad de PKR en células infectadas por ALVAC (II), permitiendo la intensificación del nivel y persistencia de la expresión de genes foráneos.

Entre los vectores víricos adicionales se incluyen poxvirus de huésped restringido, el virus de la viruela aviar (FPV) es el virus prototípico del género Avipox de la familia de los poxvirus. La replicación de los virus de la viruela aviar se encuentra limitada a las especies de aves (Matthews, R.E.F., Intervirology 17:42, 1982) y no existen informes en la literatura de que los virus de la viruela aviar causen una infección productiva en ninguna especie no aviar, incluyendo el ser humano. Esta restricción de huésped proporciona una barrera de seguridad inherente a la transmisión del virus a otras especies, por lo que la utilización de vectores basados en el virus de la viruela aviar en aplicaciones veterinarias y humanas resulta una opción atractiva.

El FPV ha sido utilizado ventajosamente como vector que expresa inmunógenos de patógenos de aves de corral. Se expresó la proteína hemaglutinina de un virus de influenza aviar virulento en un FPV recombinante. Tras la inoculación del recombinante en pollos y pavos, se indujo una respuesta inmunitaria que era protectora frente al reto por virus influenza virulento homólogo o heterólogo (Taylor, J. *et al.*, Vaccine 6:504, 1988). También se han desarrollado recombinantes de FPV que expresan las glucoproteínas de superficie del virus de la enfermedad de Newcastle (Taylor, J. *et al.*, J. Virol. 64:1441, 1990; Edbauer, C. *et al.*, Virology 179:901, 1990; patente US nº 5766599, incorporada en la presente memoria como referencia).

También se ha utilizado una cepa altamente atenuada de Vaccinia, denominada MVA, como vector para las vacunas basadas en poxvirus. La utilización de MVA se da a conocer en la patente US nº 5.185.146.

Se han preparado otros vectores poxvirus atenuados mediante modificación genética de cepas de tipo salvaje de Vaccinia. El vector NYVAC, por ejemplo, se deriva mediante delección de genes específicos de virulencia y de rango de huésped de la cepa Copenhagen de Vaccinia (Tartaglia, J. *et al.*, *supra*, 1992; patentes US nº 5364773 y 5494807, incorporadas en la presente memoria como referencia) y ha demostrado resultar útil como vector recombinante en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora frente a antígenos foráneos expresados.

Pueden construirse virus recombinantes mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, tal como se describe anteriormente para los virus Vaccinia y avipox, patentes US n° 4769330, n° 4722848, n° 4603112, n° 5110587 y n° 5174993, la totalidad de las cuales se incorporan a la presente memoria como referencia).

5 En formas de realización adicionales de la invención, también pueden utilizarse como vectores bacterias vivas y/o atenuadas. Por ejemplo, las cepas mutantes de *Vibrio cholerae* no toxicogénicas pueden resultar útiles como vectores bacterianos en formas de realización de la presente invención, tal como se describe en la patente US n° 4.882.278 (que da a conocer una cepa en la que una cantidad sustancial de la secuencia codificante de cada uno de los dos alelos ctxA ha sido delecionado de manera que no se produce ninguna toxina funcional del cólera), patente WO n° 92/11354 (cepa
10 en la que el locus irgA se encuentra inactivado por mutación; esta mutación puede combinarse en una sola cepa con mutaciones de ctxA) y la patente WO n° 94/1533 (mutante por delección que carece de ctxA funcional y secuencias de ADN attRS1). Estas cepas pueden manipularse genéticamente para expresar antígenos heterólogos, tal como se describe en la patente WO n° 94/19482 (la totalidad de las patentes/solicitudes de patente publicadas anteriormente indicadas se incorporan en la presente memoria como referencia).

15 Las cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*, manipuladas genéticamente para la expresión recombinante de antígenos heterólogos y la utilización de las mismas como inmunógenos orales se describen, por ejemplo, en la patente WO n° 92/11361.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, los expertos en la materia reconocerán fácilmente que otras cepas bacterianas útiles como vectores bacterianos en formas de realización de la presente invención incluyen (aunque sin limitación) *Shigella flexneri*, *Streptococcus gordonii* y el bacilo de Calmette-Guerin (tal como se describe en las patentes WO n° 88/6626, n° 90/0594, n° 91/13157, n° 92/1796 y n° 92/21376, la totalidad de las cuales se incorpora en la presente memoria como referencia). En las formas de realización de vector bacteriano de la presente invención, puede insertarse
25 un ácido nucleico codificante de un antígeno tumoral en el genoma bacteriano, puede permanecer en estado libre o puede ser transportador en un plásmido.

Se contempla además que la invención incluya vectores que comprenden ácidos nucleicos codificantes de por lo menos un elemento de entre el grupo constituido por citoquinas, linfoquinas y moléculas inmunoestimuladoras.
30 Dichas secuencias de ácidos nucleicos pueden ser contiguas a secuencias codificantes del antígeno tumoral o pueden encontrarse codificadas en ácidos nucleicos diferentes.

Las células que comprenden los antígenos tumorales anteriormente indicados, los ácidos nucleicos codificantes de los mismos y/o los vectores comprenden formas de realización adicionales de la invención. Entre estas células se
35 incluye cualquier célula potencial en la que pueda introducirse y/o transfectarse y/o infectarse el antígeno tumoral, ácido nucleico y/o vector anteriormente indicados (por ejemplo bacterias, células COS, células Vero, fibroblastos de embrión de pollo, células tumorales, células presentadoras de antígeno, células dendríticas, etc.). La elección de procedimiento para la introducción y/o transfección y/o infección de células depende de la naturaleza intrínseca del agente introducido (es decir, ADN libre, plásmido, virus recombinante), tal como será conocido por el experto en la materia (por ejemplo, tal como se enseña en Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.* (editores), J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis (editores), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A., 1989, capítulos
40 1, 2, 3 y 16).

45 Entre las formas de realización adicionales de la invención se incluyen vacunas que comprenden antígenos tumorales y/o ácidos nucleicos codificantes de los mismos y/o vectores y/o células anteriormente indicadas.

La vacuna de la invención que comprende el antígeno tumoral puede ser una vacuna multivalente y contener adicionalmente varios péptidos, epítopos o fragmentos de un antígeno tumoral particular o contener péptidos relacionados
50 con otros antígenos tumorales y/o agentes infecciosos de una manera profilácticamente o terapéuticamente eficaz. Las vacunas multivalentes contra cánceres pueden contener varios TAAs individuales o fragmentos inmunogénicos de los mismos, solos o en combinaciones que resulten eficaces en la modulación de una respuesta inmunitaria frente al cáncer.

55 Una vacuna de la invención puede contener una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral de la invención. Dichas vacunas se denominan vacunas de ácido nucleico, aunque también se denominan vacunas genéticas, vacunas polinucleótidas o vacunas de ADN, la totalidad de las cuales se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. En dicha forma de realización, el antígeno tumoral se produce *in vivo* en el animal huésped. Entre las formas de realización adicionales de la invención se incluyen vectores (es decir, bacterias,
60 virus recombinantes) que comprenden los ácidos nucleicos anteriormente indicados.

La presente invención también contempla mezclas de los antígenos tumorales, ácidos nucleicos codificantes de los mismos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, células y/o vacunas que comprenden lo anteriormente
65 indicado, y por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo constituido por citoquinas, linfoquinas, moléculas inmunoestimuladoras y ácidos nucleicos codificantes de las mismas. Entre las formas de realización adicionales de la presente invención se incluyen además composiciones farmacéuticas que comprenden los antígenos tumorales anteriormente indicados, ácidos nucleicos codificantes de los mismos, vectores, células, vacunas o mezclas para la administración en sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. La expresión

sión “forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*” se refiere a una forma de la sustancia que debe administrarse en la que cualquier efecto tóxico resulta superado por los efectos terapéuticos. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, o una “cantidad eficaz”, se define como una cantidad eficaz a las dosis y durante los periodos de tiempo, necesarios para alcanzar el resultado deseado de inducir una respuesta inmunitaria en un animal. La cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia puede variar según factores tales como el estado de enfermedad/salud, edad, sexo y peso del receptor, y la capacidad inherente del antígeno tumoral particular, ácido nucleico codificante del mismo, vector, célula o vacuna de inducir una respuesta inmunitaria deseada. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o a intervalos periódicos y/o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias o circunstancias.

Las composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria pueden prepararse mediante procedimientos conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse en animales, de manera que se combina una cantidad eficaz de la sustancia activa (es decir, el antígeno tumoral, ácido nucleico, virus recombinante, vacuna) en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en “Handbook of Pharmaceutical Additives” (compilado por Michael e Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, Inglaterra, 1995). Sobre esta base, entre las composiciones se incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y pueden contenerse en soluciones tamponadas con un pH adecuado y/o ser isoosmóticos con los líquidos fisiológicos. A este respecto, puede hacerse referencia a la patente US n° 5.843.456. Estas composiciones pueden comprender además un adyuvante (tal como se indica posteriormente).

Entre las formas de realización adicionales de la invención se incluyen procedimientos para inhibir una célula cancerosa que expresa un antígeno tumoral en un paciente, que comprende administrar en dicho paciente una cantidad eficaz de un antígeno tumoral, ácido nucleico codificante del mismo, vector, célula o vacuna de la invención. Entre los pacientes con tumores sólidos que expresan antígenos tumorales se incluyen (aunque sin limitación) aquellos que sufren de cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de tiroides, melanoma, cáncer oral, cáncer de laringe, seminoma, cáncer hepatocelular, cáncer de conducto biliar, carcinoma de células escamosas y cáncer de próstata. Como tales, los procedimientos para tratar los pacientes con cáncer *per se* que incluyen los procedimientos anteriormente indicados de inducir una respuesta inmunitaria y/o de inhibir una célula que expresa antígeno tumoral se contemplan aspectos/formas de realización de la invención.

Tal como se ha indicado anteriormente, puede inmunizarse un animal con un antígeno tumoral, un ácido nucleico codificante del mismo, vector, célula o vacuna de la invención mediante la administración de lo anteriormente indicado en un sitio linfático. La administración puede conseguirse en una sola dosis o repetida a intervalos. La dosis apropiada depende de diversos parámetros que entienden los expertos en la materia, tales como el inmunógeno mismo (es decir polipéptido vs. ácido nucleico (y más específicamente el tipo de los mismos)), la vía de administración y la condición del animal que debe vacunarse (peso, edad y similar).

Tal como se ha indicado anteriormente, los ácidos nucleicos (en particular plásmidos y/o ADN y/o ARN libre/desnudo codificante del antígeno tumoral de la invención) pueden administrarse en un animal a los fines de inducir/iniciar una respuesta inmunitaria (por ejemplo la patente US n° 5589466; McDonnell y Askari, NEJM 334:42-45, 1996; Kowalczyk y Ertl, Cell Mol. Life Sci. 55:751-770, 1999). Típicamente este ácido nucleico es una forma que es incapaz de replicarse en la célula animal diana y es incapaz de integrarse en el genoma de dicho animal. La molécula de ADN/ARN codificante del antígeno tumoral también se sitúa típicamente bajo el control de un promotor adecuado para la expresión en la célula del animal. El promotor puede funcionar ubicuamente o específicamente en un tejido. Entre los ejemplos de promotores no específicos de tejido se incluyen el promotor temprano del citomegalovirus (CMV) (descrito en la patente US n° 4.168.062) y el promotor del virus del sarcoma de Rous. El promotor desmina es específico de tejido y regula la expresión en células musculares. Más generalmente, se han descrito vectores útiles (es decir, la patente WO n° 94/21797).

Para la administración de ácidos nucleicos codificantes de un antígeno tumoral, dicho ácido nucleico puede codificar un precursor o forma madura del polipéptido/proteína. En el caso de que codifique una forma precursora, la forma precursora puede ser homóloga o heteróloga. En el último caso, puede utilizarse una secuencia de líder eucariótico, tal como la secuencia líder del factor del plasminógeno de tipo tisular (tPA).

Para la utilización como inmunógeno, puede formularse un ácido nucleico de la invención según diversos procedimientos conocidos por el experto en la materia. En primer lugar, puede utilizarse un ácido nucleico en una forma desnuda/libre, libre de cualquier vehículo de administración (tal como liposomas aniónicos, lípidos catiónicos, micropartículas (por ejemplo micropartículas de oro), agentes de precipitación (por ejemplo fosfato de calcio) o cualquier otro agente facilitador de la transfección. En este caso, el ácido nucleico puede simplemente diluirse en una solución fisiológicamente aceptable (tal como solución salina estéril o solución salina tamponada estéril) con o sin un portador. En caso de encontrarse presente, el portador preferentemente es isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y presenta una fuerza iónica relativamente reducida (tal como proporciona una solución de sacarosa (por ejemplo una solución que contiene 20% de sacarosa)).

Alternativamente, puede asociarse un ácido nucleico con agentes que asistan en la incorporación celular. Puede, por ejemplo, (i) complementarse con un agente químico que modifique la permeabilidad celular (tal como bupivacaína;

ver, por ejemplo, la patente WO n° 94/16737), (ii) encapsularse en liposomas, o (iii) asociarse a lípidos catiónicos o a micropartículas de sílice, oro o tungsteno.

Los lípidos catiónicos son bien conocidos en la técnica y se utilizan comúnmente para la administración génica.

- 5 Entre dichos lípidos se incluyen lipofectina (también conocida como DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N-trimetilamonio), DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)-propano), DDAB (bromuro de dimetildioctadecilamonio), DOGS (dioctadecilamidoglicil-espermina) y derivados del colesterol, tales como DC-Chol (3-beta-(N-(N',N'-dimetil-aminometano)-carbamoil)-colesterol). Puede encontrarse una descripción de dichos lípidos catiónicos en las patentes EP n° 187702, WO n° 90/11092, US n° 5283185, WO n° 91/15501, WO n° 95/26356 y US n° 5527928.
- 10 Los lípidos catiónicos para la administración génica preferentemente se utilizan en asociación con un lípido neutro, tal como DOPE (dioleil-fosfatidiletanolamina) tal como se describe, por ejemplo, en la patente WO n° 90/11092.

Pueden añadirse otros compuestos facilitadores de la transfección a una formulación que contiene liposomas catiónicos. Se describen varios de ellos en, por ejemplo, las patentes WO n° 93/18759, n° 93/19768, n° 94/25608 y n° 95/2397. Entre ellos se incluyen, por ejemplo, derivados de espermina útiles para facilitar el transporte de ADN a través de la membrana nuclear (ver, por ejemplo, la patente WO n° 93/18759) y compuestos permeabilizantes de la membrana, tales como GALA, gramicidina S y sales biliares catiónicas (ver, por ejemplo, la patente WO n° 93/19768).

- También pueden utilizarse micropartículas de oro o de tungsteno para la administración de ácidos nucleicos (tal como se describe en las patentes WO n° 91/359 y n° 93/17706). En este caso, las micropartículas recubiertas de polinucleótidos pueden inyectarse mediante vías intradérmicas o intraepidérmicas utilizando un dispositivo de inyección sin aguja ("pistola génica", tal como aquellos descritos, por ejemplo, en las patentes US n° 4.945.050, n° 5.015.580 y WO n° 94/24263).

- 25 Los liposomas aniónicas y neutros también son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Liposomes: A Practical Approach, RPC New Ed., IRL Press, 1990) para una descripción detallada de procedimientos para preparar liposomas) y resultan útiles para administrarse un amplio abanico de productos, incluyendo ácidos nucleicos.

- Entre las formas de realización particulares de los procedimientos anteriormente indicados (es decir, para inducir/iniciar respuestas inmunitarias) se incluyen protocolos de iniciación-refuerzo para la administración de inmunógenos de la invención. Más específicamente, entre estos protocolos se incluyen (aunque sin limitación) una etapa de "iniciación" con una forma particular/diferente de inmunógeno (es decir, ácido nucleico (por ejemplo plásmido, bacteriano/vírico/libre o desnudo) codificante de antígeno tumoral, o vector (es decir, virus, bacteria recombinantes) que comprende dicho ácido nucleico) seguido de por lo menos una etapa de "refuerzo", comprendiendo la administración de una forma alternativa (es decir, diferente de la utilizada para "iniciar") del antígeno tumoral (es decir la proteína o fragmento de la misma (por ejemplo epítipo/péptido), ácido nucleico codificante del antígeno tumoral (o fragmento del mismo) o vector que comprende dicho ácido nucleico). Los ejemplos de metodologías de "iniciación-refuerzo" son conocidos por los expertos en la materia (tal como se enseña, por ejemplo, en las solicitudes de patente PCT publicadas WO n° 98/58956, n° 98/56919, n° 97/37991). Una ventaja de dichos protocolos es el potencial de evitar el problema de generar respuestas inmunitarias neutralizadoras frente a vectores *per se* (es decir, virus recombinantes), en los que se insertan/incorporan ácidos nucleicos codificantes del inmunógeno o fragmentos del mismo (ver, por ejemplo, R.M. Conry *et al.*, Clin. Cancer Res. 6:34-41, 2000).

- Tal como es bien conocido por el experto ordinario en la materia, puede mejorarse la capacidad de un inmunógeno de inducir/iniciar una respuesta inmunitaria en el caso de que, con independencia de la formulación de administración (es decir, virus recombinante, ácido nucleico o polipéptido), dicho inmunógeno se coadministre con un adyuvante. Se describen y comentan adyuvantes en "Vaccine Design-the Subunit and Adjuvant Approach" (editado por Powell y Newman, Plenum Press, New York, U.S.A., páginas 61 a 79 y 141 a 228, 1995). Los adyuvantes típicamente intensifican la inmunogenicidad de un inmunógeno, aunque no son necesariamente inmunogénicos por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el inmunógeno localmente próximo al sitio de administración, produciendo un efecto depósito y facilitando una liberación sostenida lenta de agente inmunizante en células del sistema inmunológico. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmunológico a un depósito de inmunógeno y estimular que dichas células induzcan respuestas inmunitarias. Como tales, las formas de realización de la presente invención incluyen composiciones que comprenden además adyuvantes.

Entre las características deseables de los adyuvantes ideales se incluyen:

- 1) falta de toxicidad,
- 2) capacidad de estimular una respuesta inmunitaria de larga duración,
- 3) simplicidad de fabricación y estabilidad en el almacenamiento de larga duración,
- 4) capacidad de inducir respuestas tanto celulares como humores frente a antígenos administrados por diversas vías, en caso necesario,

- 5) sinergia con otros adyuvantes,
- 6) capacidad de interactuar selectivamente con poblaciones de células presentadoras de antígeno (APC),
- 7) capacidad de inducir específicamente respuestas inmunitarias específicas de células TH1 o TH2, y
- 8) capacidad de incrementar selectivamente los niveles de isotipo de anticuerpo apropiado (por ejemplo IgA) frente a los antígenos/inmunógenos.

10

Sin embargo, muchos adyuvantes son tóxicos y pueden causar efectos secundarios no deseables, comportando de esta manera que resulten inadecuados para la utilización en seres humanos y en muchos animales. Por ejemplo, algunos adyuvantes pueden inducir granulomas, inflamaciones agudas y crónicas (adyuvante completo de Freund (FCA)), citolisis (saponinas y polímeros plurónicos) y pirogenicidad, artritis y uveitis anterior (dipéptido muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS)). En efecto, únicamente el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (denominados colectivamente alúmina) se utilizan rutinariamente como adyuvantes en seres humanos y en vacunas veterinarias. La eficacia de la alúmina en el incremento de las respuestas de anticuerpos frente a toxoides de la difteria y del tétanos se encuentra bien establecida. Sin embargo, presenta limitaciones. Por ejemplo, la alúmina resulta ineficaz para la vacunación de la influenza e induce inconsistentemente una respuesta inmunitaria mediada por células con otros inmunógenos. Los anticuerpos inducidos por los antígenos con adyuvante alúmina son principalmente del isotipo IgG1 en el ratón, no resultando óptimos para la protección en contextos de vacunación.

Los adyuvantes pueden caracterizarse como “intrínsecos” o “extrínsecos”. Los adyuvantes intrínsecos (tales como los lipopolisacáridos) son componentes integrales y normales de agentes que por sí mismos son utilizados como vacunas (es decir, bacterias muertas o atenuadas). Los adyuvantes extrínsecos típicamente son inmunomoduladores no integrales generalmente unidos a antígenos de una manera no covalente, y se formulan con el fin de intensificar la respuesta inmunitaria del huésped.

En las formas de realización de la invención, los adyuvantes pueden ser por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo constituido por citoquinas, linfoquinas y moléculas coestimuladoras. Entre los ejemplos se incluyen (aunque sin limitación) interleuquina 2, interleuquina 12, interleuquina 6, interferón gamma, factor alfa de necrosis tumoral, GM-CSF, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3 y CD72. Entre las formas de realización particulares se incluyen específicamente la utilización de GM-CSF como adyuvante (tal como se enseña, por ejemplo, en las patentes US nº 5679356, nº 5904920, nº 5637483, nº 5759535, nº 5254534, solicitud de patente europea nº EP 211684 y documento de publicación de patente PCT nº WO 97/28816, la totalidad de los cuales se incorporan como referencia en la presente memoria).

Se ha descrito una diversidad de potentes adyuvantes extrínsecos. Entre estos se incluyen (aunque sin limitación) saponinas acopladas a antígenos proteína membranal (complejos inmunoestimuladores), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias muertas y aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos, tales como dipéptido muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas.

La utilización de saponinas *per se* como adyuvantes también es bien conocida (Lacaille-Dubois, M. y Wagner, H., *Phytomedicine* 2:363, 1996). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina) y fracciones del mismo ha sido descrito extensivamente (patente US nº 5057540; Kensil, C.R., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12:1, 1996 y patente europea nº EP 362279). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas mediante HPLC de Quil A) han sido descritas como potentes adyuvantes sistémicos (patente US nº 5057540; patente europea nº EP 362279). También se describe en estas referencias la utilización de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como potente adyuvante para vacunas sistémicas. La utilización de QS21 se describe adicionalmente en Kensil *et al.*, *J. Immunol.* 146:431, 1991). También son conocidas combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (patente WO nº 99/10008). Se describen sistemas adyuvantes particulados que comprenden fracciones de Quil A (tales como QS21 y QS7) en la patente WO nº 9633739 y en la patente WO nº 9611711.

Otro adyuvante/inmunoestimulador preferido es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados (“CpG”). CpG es una abreviatura para motivos dinucleótidos citosina-guanina presentes en el ADN. Se conoce de la técnica CpG como adyuvante cuando se administra por vía tanto sistémica como mucosal (patente WO nº 9602555; patente europea nº EP 468520; Davies *et al.*, *J. Immunol.* 160:87, 1998; McCluskie y Davis, *J. Immunol.* 161:4463, 1998). En varios estudios también se ha demostrado que oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias de gen BCG resultan capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*; Krieg, *Nature* 374:546, 1995). Los análisis detallados de las secuencias de oligonucleótidos inmunoestimuladores han demostrado que el motivo CG debe encontrarse en determinado contexto de secuencia, y que dichas secuencias son comunes en el ADN bacteriano pero son raras en el ADN de vertebrados. Por ejemplo, la secuencia inmunoestimuladora con frecuencia es: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina, en las que el motivo CG no se encuentra metilado; sin embargo, se conocen otras secuencias de CpG no metiladas que son inmunoestimuladores y como tales también podrían utilizarse en la presente invención). Tal como resultará evidente para el experto ordinario en la materia, dichos motivos/secuencias CG pueden incorporarse en ácidos nucleicos de la invención *per se*, o residir en ácidos nucleicos diferentes.

Se enseñan en la técnica una diversidad de otros adyuvantes, y como tales se encuentran comprendidos en formas de realización de la presente invención. La patente US n° 4.855.283, concedida a Lockhoff *et al.* (incorporada en la presente memoria como referencia) da a conocer análogos glucolípidos y la utilización de los mismos como adyuvantes. Entre ellos se incluyen N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales se sustituye en el residuo azúcar con un aminoácido, tal como los inmunomoduladores o los adyuvantes. Además, Lockhoff *et al.*, Chem. Int. Ed. Engl. 30:1611, 1991, han informado de que los análogos N-glucolípidos que muestran similitudes estructurales con los glucolípidos naturales (tales como los glucofosfolípidos y los glucoglicerolípidos) también son capaces de inducir fuertes respuestas inmunitarias tanto en la vacuna del virus del herpes simplex como en la vacuna del virus de la pseudorrabia.

La patente US n° 4.258.029 concedida a Moloney (incorporada en la presente memoria como referencia) enseña que el hidrocloreto de octadecil tirosina (OTH) funciona como adyuvante cuando se acompleja con el toxoide tetánico y la vacuna del virus de la poliomielitis de tipos I, II y III inactivada con formalina. Nixon-George *et al.*, J. Immunol. 14:4798, 1990, también han informado de que los ésteres octadecilo de aminoácidos aromáticos acomplejados con un antígeno de superficie de hepatitis B recombinante intensificaron las respuestas inmunitarias del huésped frente al virus de la hepatitis B.

También pueden seleccionarse compuestos adyuvantes de entre los polímeros del ácido acrílico o del ácido metacrílico y de entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado alquenilo. Los compuestos adyuvantes son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que se encuentran reticulados, especialmente con éteres polialquénilos de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos con el término carbómero (Pharmaceutica vol. 8, n° 2, junio de 1996). Preferentemente, se prepara una solución de adyuvante según la invención, especialmente de carbómero, en agua destilada, preferentemente en presencia de cloruro sódico, siendo la solución obtenida de pH ácido. Esta solución madre se diluye mediante la adición de la misma a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o una parte sustancial de la misma, de agua cargada con NaCl, preferentemente solución salina fisiológica (NaCl 9 g/l) de una vez en varias partes con la neutralización concomitante o posterior (pH 7,3 a 7,4), preferentemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se utiliza sin modificación para la mezcla con el agente inmunizador, pudiendo almacenar dicha mezcla en forma liofilizada, líquida o congelada.

Los expertos en la materia también pueden referirse a la patente US n° 2.909.462 (incorporada en la presente memoria como referencia), que describe adyuvantes que incluyen polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que presenta por lo menos 3 grupos hidroxilo (preferentemente no más de 8), sustituyendo los átomos de hidrógeno de por lo menos los tres hidroxilos, con radicales alifáticos insaturados que presentan por lo menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferentes son aquellos que contienen entre 2 y 4 átomos de carbono (por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados). Los radicales insaturados mismos pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados bajo el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, USA) resultan particularmente apropiados. Se reticulan con alil-sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos pueden indicarse Carbopol (por ejemplo 974P, 934P y 971P). Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado alquenilo, los copolímeros EMA (Monsanto, que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno, lineales o reticulados, por ejemplo reticulados con éter divinílico) resultan preferentes. Puede hacerse referencia a J. Fields *et al.*, Nature 186:778, 1960, para una descripción adicional de estos compuestos químicos (incorporada en la presente memoria como referencia).

En aspectos adicionales de la presente invención, entre los adyuvantes útiles para la administración parenteral de agente inmunizante se incluyen compuestos de aluminio (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio e hidroxifosfato de aluminio; pero también puede ser una sal de calcio, hierro o zinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónicamente o aniónicamente derivatizados, o polifosfocenos). El antígeno puede precipitarse o adsorberse sobre el compuesto de aluminio según protocolos estándares bien conocidos por los expertos en la materia.

Entre otros adyuvantes comprendidos en formas de realización de la presente invención se incluyen lípido A (en particular monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL)). 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribi Immunochem., Montana. Con frecuencia se suministra químicamente en forma de una mezcla de monofosforil lípido A 3-de-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Puede prepararse mediante procedimientos dados a conocer en la patente GB n° 2122204B. Una forma preferente de 3D-MPL se encuentra en forma de formulación particulada que presenta un tamaño de partícula inferior a 0,2 μm de diámetro (patente europea n° EP 689454).

Entre los adyuvantes para la inmunización mucosal pueden incluirse toxinas bacterianas (por ejemplo la toxina del cólera (CT), la toxina termolábil de *E. coli* (LT), la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina pertussis (PT) o las combinaciones, subunidades, toxoides o mutantes de los mismos). Por ejemplo, puede resultar de utilidad una preparación purificada de subunidad B de toxina nativa del cólera (CTB). Los fragmentos, homólogos, derivados y la fusión de cualquiera de dichas toxinas también resultan adecuadas, con la condición de que conserven actividad de adyuvante. Puede utilizarse un mutante que presente toxicidad reducida. Se han descrito mutantes (por ejemplo en la patente WO n° 95/17211 (mutante CT Arg-7-Lys), la patente WO n° 96/6627 (mutante LT Arg-192-Gly) y la patente WO n° 95/34323 (mutantes PT Arg-9-Lys y Glu-129-Gly). Entre los mutantes LT adicionales se incluyen, por ejemplo, los mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp y Glu-112-Asp. También pueden utilizarse otros adyuvantes (tales como monofosforil lípido A bacteriano (MPLA)) de diversas fuentes (por ejemplo *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*) en la administración mucosal de agentes inmunizadores.

Entre los adyuvantes útiles para la inmunización tanto mucosal como parenteral se incluyen polifosfaceno (por ejemplo la patente WO n° 95/2415), DC-chol (3-b-(N-(N',N'-dimetil-aminometano)-carbamoil)-colesterol (por ejemplo la patente US n° 5.283.185 y WO n° 96/14831) y QS-21 (por ejemplo la patente WO n° 88/9336).

Los adyuvantes/inmunoestimuladores tal como se describen en la presente memoria pueden formularse conjuntamente con portadores, tales como, por ejemplo, liposomas, emulsiones de aceite en agua y/o sales metálicas, incluyendo sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL puede formularse con hidróxido de aluminio (tal como se comenta en la patente EP n° 689454) o con emulsiones de aceite en agua (tal como se comenta en la patente WO n° 95/17210), QS21 puede formularse ventajosamente con liposomas que contienen colesterol (tal como se comenta en la patente WO n° 96/33739), en emulsiones de aceite en agua (tal como se comenta en la patente WO n° 95/17210) o en alúmina (tal como se comenta en la patente WO n° 98/15287). Cuando se formulan en vacunas, los oligonucleótidos inmunoestimuladores (es decir, CpGs) se administran generalmente en solución libre conjuntamente con antígeno libre (tal como se comenta en la patente WO n° 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*, 1998), conjugados covalentemente con un antígeno (tal como se comenta en la patente WO n° 98/16247) o se formulan con un portador, tal como hidróxido de aluminio o con alúmina (tal como se comenta en Davies *et al.*, *supra*, Brazolot-Millan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 95:15553, 1998).

Las combinaciones de adyuvantes/inmunoestimuladores también se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede utilizarse una combinación de monofosforil-lípido A y un derivado de saponina (tal como se describe en las patentes WO n° 94/00153, n° 95/17210, n° 96/33739, n° 98/56414, n° 99/12565, n° 99/11214), o más particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL (tal como se describe en la patente WO n° 94/00153). Una combinación de un oligonucleótido inmunoestimulador y una saponina (tal como QS21), o una combinación de monofosforil-lípido A (preferentemente 3D-MPL) en combinación con una sal de aluminio también forma un potente adyuvante para la utilización en la presente invención.

El ejemplo no limitativo siguiente es ilustrativo de la presente invención:

Ejemplos

Ejemplo 1

El presente ejemplo compara la inyección intranodal con inyección subcutánea de un antígeno tumoral representativo (gp100 modificado).

Métodos y diseño experimental

Sistema de ensayo

Monos cinomolgus (*Macaca fascicularis*), animales criados expresamente.

Suministrador: Siconbrec "Simian Conservation Breeding & Research Center Inc.", Fema Building, 44 Gil Puyat Avenue Makati, Metro Manila, Filipinas.

Número de animales en el estudio: 12 (6 machos y 6 hembras).

Edad al inicio del tratamiento: 26 a 38 meses.

Intervalo de peso corporal al inicio del tratamiento (día -1):

- machos: 1,73 a 2,34 kg
- hembras: 1,71 a 2,65 kg.

Cuidados de los animales

- Alojamiento: una sala con aire acondicionado,
- temperatura: 19°C a 25°C (intervalo diana),
- humedad relativa: >40%
- renovación de aire: mínimo de 8 renovaciones por hora,
- ciclo de luz: 12 horas de luz (artificial)/12 horas de oscuridad,

ES 2 306 670 T3

- jaulas: los animales se albergaron individualmente en jaulas de malla de acero inoxidable (de aproximadamente 540 x 810 x 760 mm),
- dieta: dieta para primates comercial completa expandida (dieta Mazuri, Special Diet Services Ltd., Witham, Essex, CM8, 3AD, Reino Unido) analizada para contaminantes químicos y bacterianos,

Cantidad distribuida: 100 g de dieta/animal/día.

Además, los animales recibieron fruta diariamente (manzana o plátano).

Los animales se sometieron a ayuno durante por lo menos 16 horas antes del muestreo de sangre para los análisis de laboratorio clínico y antes de la necropsia.

- Agua: agua potable *ad libitum* (en botellas).
- Contaminantes: no se encontraba presente ningún contaminante conocido en la dieta o en el agua a niveles que pudiesen interferir con la consecución del objetivo del estudio.

Procedimientos pretratamiento

- Procedimiento de salud animal: todos los animales recibieron un examen clínico para identificar estados de enfermedad tras la recepción y un examen clínico veterinario durante el periodo de aclimatación.
- Periodo de aclimatación: por lo menos 3 semanas entre la recepción del animal y el inicio del tratamiento.

Diseño experimental

- La asignación a grupos de tratamiento se llevó a cabo durante el periodo de aclimatación utilizando un procedimiento de asignación aleatoria basado en clases de peso corporal.
- Los animales se asignaron a los grupos de tratamiento mostrados en la Tabla 1. Los niveles de dosis administrados se muestran en la Tabla 2.

Administración de los productos de ensayo/control

Animales de los grupos 1 y 2

- Procedimiento de administración: inyección en el nódulo linfático inguinal izquierdo. Los animales se anestesiaron levemente antes de cada administración mediante una inyección intramuscular de hidrocloreto de quetamina (Imalgene® 500 - Merial, Lyon, Francia). Se llevó a cabo la inyección en el mismo nódulo linfático en cada ocasión (lado izquierdo). Tras cada inyección se realizó una desinfección local con yodo (Vétédine® - Vétoquinol, Lure, Francia).

Grupo 3

- Vía: subcutánea.
- Procedimiento de administración: inyección de bolo utilizando una jeringa y aguja estériles introducidos subcutáneamente. Se utilizaron cuatro sitios de inyección seguido de la desinfección local con yodo (Vétédine® - Vétoquinol, Lure, Francia). Los animales también se anestesiaron levemente antes de cada administración mediante una inyección intramuscular de hidrocloreto de quetamina (Imalgene® 500 - Merial, Lyon, Francia) con el fin de encontrarse bajo las mismas condiciones que con los animales de los grupos 1 y 2.

Se utilizaron cuatro sitios de inyección en las regiones dorsal cervical/interescapular, tal como se muestra en la Tabla 3.

Análisis ELISPOT

Se utilizó un ensayo ELISPOT con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria mediada por células generada en los monos en los diversos grupos de tratamiento. En particular, se utilizó un ensayo ELISPOT de IFN γ con el fin de medir la producción de IFN γ a partir de linfocitos T obtenidos de los monos en respuesta a los antígenos gp100.

ES 2 306 670 T3

Materiales y métodos

Placas: placa HA Multiscreen MILLIPORE/MAHA S45.10 (96 pocillos)

Anticuerpos de captura: anticuerpos anti-IFN γ monoclonales MABTECH/G-Z4 1 mg/ml.

Anticuerpos de detección: anticuerpos anti-IFN γ monoclonales MABTECH/7-B6-1-biotina 1 mg/ml.

Enzima: SIGMA, conjugado de extravidina-PA/E2636.

Sustrato: BIORAD, sustrato de conjugado NBT/BCIP - fosfatasa alcalina kit/ref.: 170-64 32.

Recubrimiento

Se introdujeron 100 μ l por pocillo de anticuerpos de captura a 1 μ g/ml diluidos 1/1.000 en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,6, en la placa multipocillo. Incubación durante la noche a 4°C. Lavado 4 veces en 1X PBS.

Saturación

Se introdujeron 200 μ l por pocillo de RPMI suplementado con FCS al 10%, aminoácidos no esenciales, piruvato, tampón Hepes y Peni-Strepto. Se incubó durante 2 horas a 37°C.

Ensayo

Se sometieron a ensayo células procedentes de animales inmunizados frente a: (a) medio solo, (b) péptidos agrupados a una concentración de 1 mg/ml, y (c) un estímulo no específico (PMA-Iono). Los péptidos agrupados utilizados en el presente Ejemplo para estimular la producción de IFN- γ se derivaron a partir de gp100 y se ilustran en las Tablas 4 a 7. El volumen final de cada muestra era de 200 μ l. Se incubó durante 20 horas a 37°C. Se lavó 4 veces en 1X PBS y Tween-20 al 0,05%.

Detección

Se introdujeron 100 μ l por pocillo de anticuerpos de detección a 1 μ g/ml diluidos 1/1.000, 1X PBS, BSA al 1%, Tween-20 al 0,05%. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces en 1X PBS y Tween-20 al 0,05%.

Reacción

Se introdujeron 100 μ l de conjugado de extravidina-PA diluidos 1/6.000 en 1X PBS, BSA al 1% y Tween-20 al 0,05%. Se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces en 1X PBS y Tween-20 al 0,05%.

Adición de sustrato

Se introdujeron 100 μ l por pocillo de sustrato previamente preparado. Por ejemplo, para una placa preparar: 9,6 ml de agua destilada, 0,4 ml de tampón 25X, 0,1 ml de solución A (NBT) y 0,1 ml de solución B (BCIP). Se incubó durante un periodo de 30 a 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó en agua destilada. Se secó y se transfirió a una película de plástico. Se contó el número de manchas utilizando un analizador de imágenes Zeiss. Cada mancha corresponde a una célula T individual secretora de IFN- γ .

Resultados

Los animales con resultado positivo en el análisis ELISPOT se muestran en las figura 1 a 4. En global, los resultados demuestran que de entre los animales sometidos a ensayo, 2 de 2 (es decir, el 100%) de los animales que recibieron la administración intranodal del antígeno gp100, y 2 de 4 (es decir, el 50%) de los animales que recibieron la administración subcutánea del antígeno gp100 presentaron una respuesta inmunitaria mediada por células positiva.

Análisis ELISA

El ELISA se llevó a cabo utilizando metodología estándar conocida de la técnica. Brevemente, la gp100 humana ("hgp100", producida en Baculovirus) se diluyó en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato, pH 9,6) y se

ES 2 306 670 T3

añadió a 96 pocillos a una concentración de 0,5 µg/pocillo. Las placas se dejaron reposar a 4°C durante la noche. A continuación, las placas se lavaron y se añadió tampón de bloqueo (solución salina tamponada con fosfato/Tween-20 al 0,5%/BSA al 1,0%, pH 7,2) durante 2 horas a 37°C. A continuación, las placas se lavaron y los sueros se diluyeron en tampón de dilución (solución salina tamponada con fosfato/Tween-20 al 0,5%/BSA al 0,1%, pH 7,2). Para este estudio, se diluyeron sueros de mono 1:800 y se realizaron “7” diluciones en serie de 3 veces para cada muestra sometida a ensayo. Los controles de sueros humanos se diluyeron 1:50 en tampón de dilución y se llevaron a cabo “7” diluciones en serie de 2 veces. Cada dilución se llevó a cabo por duplicado. Las placas se incubaron durante 2 horas más a 37°C. Las placas se lavaron y el anticuerpo secundario anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (anticuerpo completo anti-Ig humana procedente de oveja (Amersham Life Science, NA933)) diluido 1:100 en tampón de dilución se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron y se añadió a los pocillos sustrato OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina) con H₂O₂ en tampón de sustrato (fosfato 50 mM/citrato 25 mM, pH 7,2). Para una ELISA cinética, la placa se leyó repetidamente (intervalos de 2 minutos durante 15 minutos) sin detención (sin tampón “de parada”). Las placas se leyeron a 450 nm.

Resultados

Los resultados del experimento anterior se presentan en la Tabla 8 y en la figura 5. Los animales del grupo 2 recibieron inyecciones intranodales de ALVAC(2)-gp100(mod) seguido de refuerzos de péptidos gp100 modificados 209(2M) y 290(9V); los animales del grupo 3 recibieron una inyección subcutánea del constructo ALVAC(2) seguido de refuerzos de péptido; los animales del grupo 1 recibieron inyecciones intranodales de solución salina como control.

Tal como puede observarse en la figura 5, la inyección intranodal de los antígenos indujo una respuesta humoral muy superior a la producida con la inyección subcutánea del antígeno.

En resumen, los resultados del presente Ejemplo demuestran que la inyección intranodal de un antígeno tumoral induce una respuesta tanto humoral como mediada por células que es muy superior que la producida al inyectar el antígeno tumoral mediante la vía subcutánea convencional de administración.

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a lo que en la actualidad se consideran los ejemplos preferidos, debe interpretarse que la invención no se encuentra limitada a los ejemplos dados a conocer.

TABLA 1

Número de grupo	Vía de administración	Días de tratamiento y compuesto administrado	Número de animales
1	Intranodal	Solución salina (NaCl al 0,9%): días 28, 42, 56 Después 70, 71, 72, 73, 74 Después 84, 85, 86, 87 y 88	4
2	Intranodal	ALVAC(2) – gp100 mod: días 28, 42, 56 *péptidos mgp100: días 70, 71, 72, 73, 74 Después 84, 85, 86, 87 y 88	4
3	Subcutánea	Solución salina (NaCl al 0,9%): día 1 ALVAC(2) – gp100 mod: días 28, 42, 56 *péptidos mgp100: días 70 y 84	4

*209(2M)-IMDQVPFSY; 290(9V) YLEPGPVTV

- Animales del grupo 1 (control) recibieron el producto de control (solución salina para inyección (NaCl al 0,9%))
- Animales del grupo 3 recibieron el producto de control (solución salina para inyección (NaCl al 0,9%)) el día 1 únicamente.

ES 2 306 670 T3

TABLA 2

Número de grupo	Nivel de dosis	Volumen de dosis (ml/administración)
1	Solución salina (NaCl al 0,9%): 0	0,250
2	Dosis: $0,25 \times 10^{7,4}$ CCID 50 ALVAC(2) – gp100 mod: 0,25 $10^{7,4}$ CCID50	0,250
	Dosis: 200 µg (total) de péptidos IMDQVPFSY (209(2M) y YLEPGPVTV (290(9V)) (100 µg cada uno)	0,2
3	Solución salina (NaCl al 0,9%)	0,250
	ALVAC(2)-gp100 mod: 0,25 $10^{7,4}$ CCID50	0,250
	Dosis: 200 µg (total) de péptidos IMDQVPFSY (209(2M) y YLEPGPVTV (290(9V)) (100 µg cada uno)	0,2

TABLA 3

Días	Sitios utilizados
1 y 28	inferior izquierda
42	superior izquierda
56	superior derecha
70	inferior izquierdo
84	inferior derecho

ES 2 306 670 T3

TABLA 4

Pool de péptidos nº 1		
Péptido	Secuencia	SEC ID Nº
1329	HLAVIGALLAVGATK	SEC ID Nº3
1330	GALLAVGATKVPRNQ	SEC ID Nº4
1331	VGATKVPRNQDWLGV	SEC ID Nº5
1332	VPRNQDWLGVSRLR	SEC ID Nº6
1333	DWLGVSRLRRTKAWN	SEC ID Nº7
1334	S RQLRTKA WNRQLYP	SEC ID Nº8
1335	TKAWNRQLYPEWTEA	SEC ID Nº9
1336	RQLYPEWTEAQRDC	SEC ID Nº10
1337	EWTEAQRDCWRGGQ	SEC ID Nº11
1338	QRDCWRGGQVSLKV	SEC ID Nº12
1339	WRGGQVSLKVSNDGP	SEC ID Nº13
1340	VSLKVSNDGPTLIGA	SEC ID Nº14
1344	IALNFPQSQKVLDPG	SEC ID Nº15
1345	PGSQKVLDPGQVIWV	SEC ID Nº16
1346	VLPDGQVIWVNNTII	SEC ID Nº17
1347	QVIWVNNTIINGSQV	SEC ID Nº18
1348	NNTIINGSQVWGGQP	SEC ID Nº19
1349	NGSQVWGGQPVYPQE	SEC ID Nº20
1350	WGGQPVYPQETDDAC	SEC ID Nº21
1351	VYPQETDDACIFPDG	SEC ID Nº22
1352	TDDACIFPDGGPCPS	SEC ID Nº23
1353	IFPDGGPCPSGWSQ	SEC ID Nº24
1355	GWSQKRSFVYVWKT	SEC ID Nº25
1356	KRSFVYVWKTWGQYW	SEC ID Nº26
1357	YVWKTWGQYWQVLGG	SEC ID Nº27
1358	WGQYWQVLGGPVSGL	SEC ID Nº28
1359	QVLGGPVSGLSIGTG	SEC ID Nº29

ES 2 306 670 T3

TABLA 5

Pool de péptidos nº 2		
Péptido	Secuencia	SEC ID Nº
1360	P VSGLS1GTGRAMLG	SEC ID Nº30
1361	SIGTGRAMLGHTME	SEC ID Nº31
1362	RAMLGHTMEVTVYH	SEC ID Nº32
1363	THTMEVTVYHRRGSR	SEC ID Nº33
1364	VTVYHRRGSRSYVPL	SEC ID Nº34
1365	RRGSRSYVPLAHSSS	SEC ID Nº35
1366	SYVPLAHSSSAFTIT	SEC ID Nº36
1368	AFTITDQVPFSVSVS	SEC ID Nº37
1369	DQVPFS V S VSQLRAL	SEC ID Nº38
1370	SVSVSQLRALDGGNK	SEC ID Nº39
1372	DGGNKHFLRNQPLTF	SEC ID Nº40
1373	HFLRNQPLTFALQLH	SEC ID Nº41
1374	QPLTFALQLHDPSGY	SEC ID Nº42
1375	ALQLHDPSGYLAED	SEC ID Nº43
1379	DFGDSSGTLISRALV	SEC ID Nº44
1380	STGLISRALVTHTY	SEC ID Nº45
1381	SRALVTHTYLEPGP	SEC ID Nº46
1382	VTHTYLEPGPVTAQV	SEC ID Nº47
1383	LEPGPVTAQVVLQAA	SEC ID Nº48
1384	VTAQVVLQAAIPLTS	SEC ID Nº49
1385	VLQAAIPLTSCGSSP	SEC ID Nº50
1386	IPLTSCGSSPVP GTT	SEC ID Nº51
1388	VP GTTDGHRPTAEAP	SEC ID Nº52
1389	DGHRPTAEAPNTTAG	SEC ID Nº53
1390	TAEAPNTTAGQVPTT	SEC ID Nº54
1392	QVPTTEVVGTT PGQA	SEC ID Nº55
1393	EVVGTT PGQAPTAEP	SEC ID Nº56

ES 2 306 670 T3

TABLA 6

Pool de péptidos nº 3		
Péptido	Secuencia	SEC ID Nº
1394	TPGQAPTAEPSGTTS	SEC ID Nº57
1395	PTAEPSGTTSVQVPT	SEC ID Nº58
1396	SGTTSVQVPTTEVIS	SEC ID Nº59
1397	VQVPTTEVISTAPVQ	SEC ID Nº60
1398	TEVISTAPVQMPTAE	SEC ID Nº61
1399	TAPVQMPTAESTGMT	SEC ID Nº62
1400	MPTAESTGMTPEKVP	SEC ID Nº63
1401	STGMTPEKVPVSEVM	SEC ID Nº64
1402	PEKVPVSEVMGTTLA	SEC ID Nº65
1403	VSEVMGTTLAEMSTP	SEC ID Nº66
1404	GTTLAEMS TPEATGM	SEC ID Nº67
1405	EMSTPEATGMTPAEV	SEC ID Nº68
1408	SIVLSGTTAAQVTT	SEC ID Nº69
1409	SGTTAAQVTTTEWVE	SEC ID Nº70
1410	AQVTTTEWVETTARE	SEC ID Nº71
1411	TEWVETTARELPIPE	SEC ID Nº72
1412	TTARELPIPEPEGPD	SEC ID Nº73
1413	LPIPEPEGPDASSIM	SEC ID Nº74
1414	PEGPDASSIMSTESI	SEC ID Nº75
1415	ASSIMSTESITGSLG	SEC ID Nº76
1416	STESITGSLGPLLDG	SEC ID Nº77
1417	TGSLGPLLDGTATLR	SEC ID Nº78
1418	PLLDGTATLRLVKRQ	SEC ID Nº79
1419	TATLRLVKRQVPLDC	SEC ID Nº80
1420	LVKRQVPLDCVLYRY	SEC ID Nº81
1421	VPLDCVLYRYGSFSV	SEC ID Nº82
1422	VLYRYGSFSVTLDIV	SEC ID Nº83

ES 2 306 670 T3

TABLA 7

Pool de péptidos nº 4		
Péptido	Secuencia	SEC ID Nº
1424	TLDIVQGIESAEILQ	SEC ID Nº84
1425	QGIESAEILQAVPSG	SEC ID Nº85
1426	AEILQAVPSGEGDAF	SEC ID Nº86
1427	AVPSGEGDAFELTVS	SEC ID Nº87
1428	EGDAFELTVSCQGGL	SEC ID Nº88
1429	ELTVSCQGGLPKEAC	SEC ID Nº89
1430	CQGGLPKEACMEISS	SEC ID Nº90
1431	PKEACMEISSPGCQP	SEC ID Nº91
1432	MEISSPGCQPPAQRL	SEC ID Nº92
1434	PAQRLCQVLPSPAC	SEC ID Nº93
1435	CQVLPSPACQLVLH	SEC ID Nº94
1436	PSPACQLVLHQILKG	SEC ID Nº95
1437	QLVLHQILKGGSGTY	SEC ID Nº96
1441	LADTNSLAVVSTQLI	SEC ID Nº97
1442	SLAVVSTQLIMPGQE	SEC ID Nº98
1443	STQLIMPGQEAGLGQ	SEC ID Nº99
1444	MPGQEAGLGQVPLIV	SEC ID Nº100
1445	AGLGQVPLIVGILLV	SEC ID Nº101
1448	LMAVVLASLIYRRRL	SEC ID Nº102
1450	YRRRLMKQDFSVPQL	SEQ.ID.Nº103
1451	MKQDFSVPQLPHSS S	SEC ID Nº104
1452	SVPQLPHSSSHWLRL	SEQ.ID.Nº105
1453	PHSSSHWLRLPRIFC	SEQ.ID.Nº106
1454	HWLRLPRIFCSCPIG	SEC ID Nº107
1455	PRIFCSCPIGENSPL	SEC ID Nº108

TABLA 8

Número de mono	DÍA (mDO/min)			
	0	57	68	96
1	3	5	2	2
2	4	6	12	10
3	7	6	10	8
4	7	6	8	8
5	5	9	20	15
6	11	8	10	12
7	11	23	51	30
8	7	30	70	22
9	1	7	5	3
10	2	6	6	4
11	3	7	14	8
12	6	9	15	6

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una cantidad eficaz de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno tumoral para la preparación de un medicamento destinado a inducir una respuesta inmunitaria en un animal frente a un antígeno tumoral, en la que el medicamento se administra en un nódulo linfático en el animal.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el tumor se selecciona de entre el grupo constituido por CEA, gp100, la familia MAGE de proteínas, DAGE, GAGE, RAGE, NY-ESO 1, melan-A/MART 1, TRP-1, TRP-2, tirosinasa, HER-2/neu, MUC-1, p53, KSA, PSA y PSMA.
3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido nucleico vírico, ADN bacteriano, plásmido de ADN, ADN desnudo/libre, y ARN.
4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el ácido nucleico vírico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido nucleico adenovírico, alfavírico y poxvírico.
5. Utilización según la reivindicación 4, en la que el ácido nucleico poxvírico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido nucleico avípox, ortopox y suípox.
6. Utilización según la reivindicación 4, en la que el ácido nucleico poxvírico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido nucleico de virus Vaccinia, de virus de la viruela aviar, de virus de la viruela del canario y de virus de la viruela porcina.
7. Utilización según la reivindicación 4, en la que el ácido nucleico poxvírico se selecciona de entre el grupo constituido por los ácidos nucleicos MVA, NYVAC, TROVAC y ALVAC.
8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el ácido nucleico se encuentra contenido en un vector.
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que el vector es un virus o bacteria recombinante.
10. Utilización según la reivindicación 9, en la que el virus recombinante se selecciona de entre el grupo constituido por adenovirus, alfavirus y poxvirus.
11. Utilización según la reivindicación 10, en la que el poxvirus se selecciona de entre el grupo constituido por virus avípox, virus ortopox y virus suípox.
12. Utilización según la reivindicación 10, en la que el poxvirus se selecciona de entre el grupo constituido por vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario y virus de la viruela porcina.
13. Utilización según la reivindicación 10, en la que el poxvirus se selecciona de entre el grupo constituido por MVA, NYVAC, TROVAC y ALVAC.
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el antígeno tumoral o ácido nucleico que codifica el mismo se encuentra contenido en una vacuna.
15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el antígeno tumoral es una versión modificada de gp100 que comprende metionina en el aminoácido 210.
16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el antígeno tumoral es una versión modificada de gp100 que comprende valina en el aminoácido 288.
17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la versión modificada de gp100 presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 110 o la figura 7.
18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el ácido nucleico presenta la secuencia de SEC ID nº 109 o la figura 6.
19. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el antígeno tumoral es una versión modificada de CEA que comprende la secuencia YLSGADLNL (SEC ID nº 113).
20. Utilización según la reivindicación 19, en la que la versión modificada de CEA presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 112 o la figura 8.
21. Utilización según la reivindicación 19, en la que la secuencia de ácidos nucleicos presenta la secuencia de SEC ID nº 111 o la figura 8.

FIGURA 1
Mono nº 6 (administración intranodal)

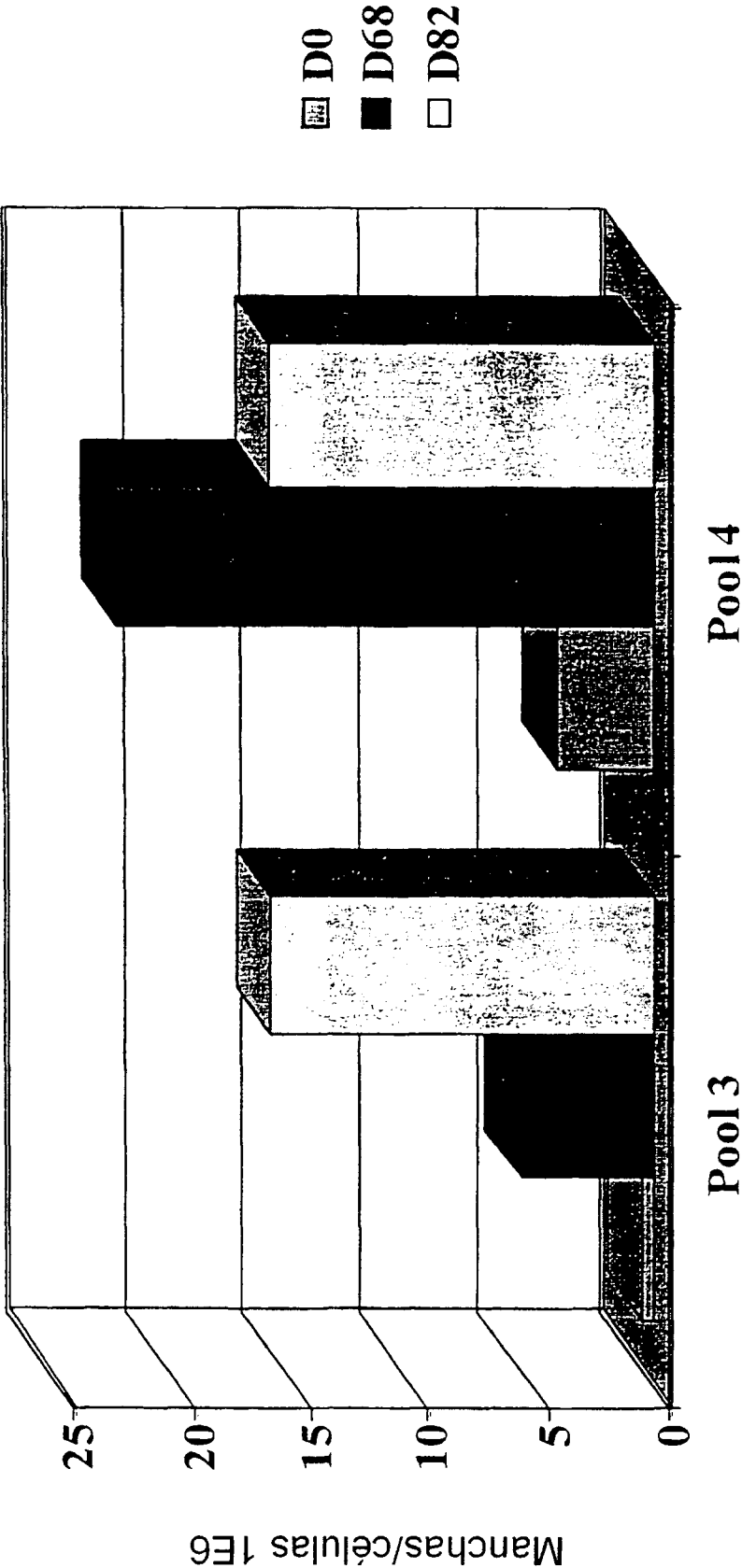


FIGURA 2

Mono nº 7 (administración intranodal)

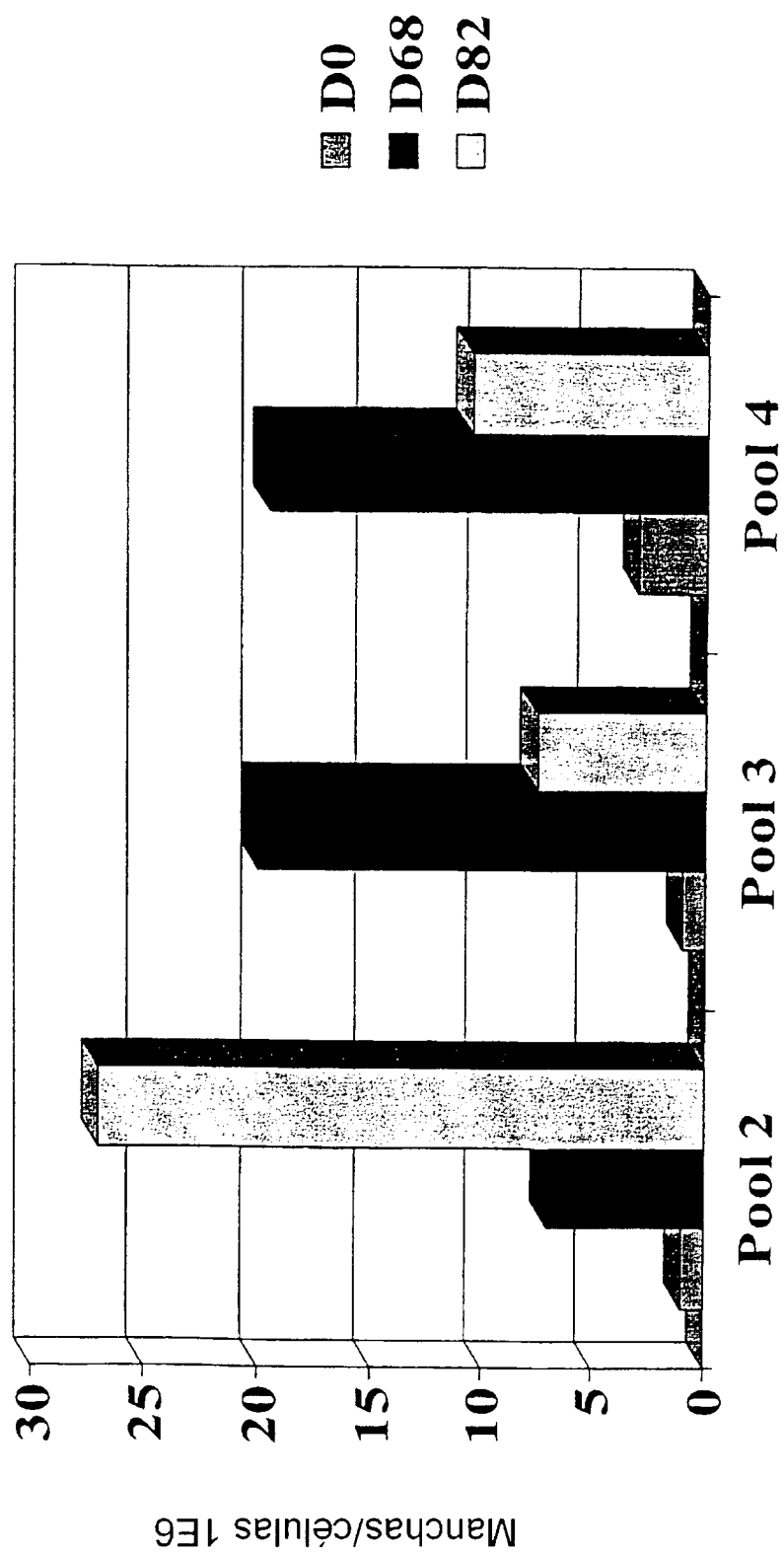


FIGURA 3
Mono nº 11 (administración subcutánea)

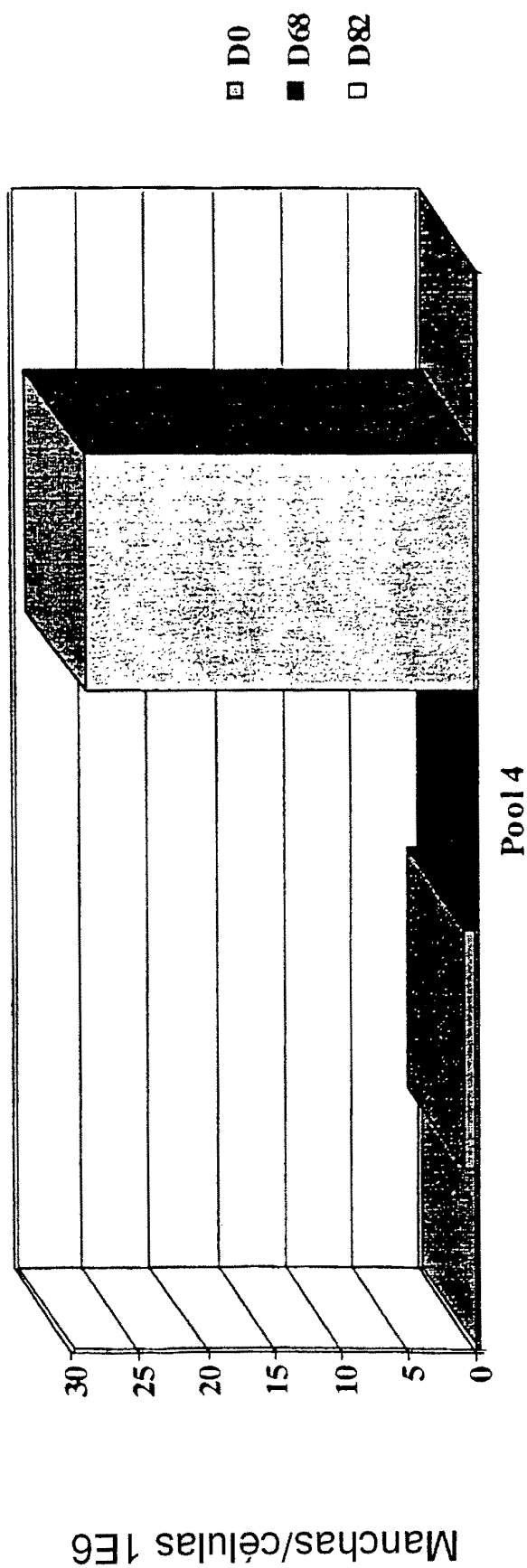


FIGURA 4
Mono nº 10 (administración subcutánea)

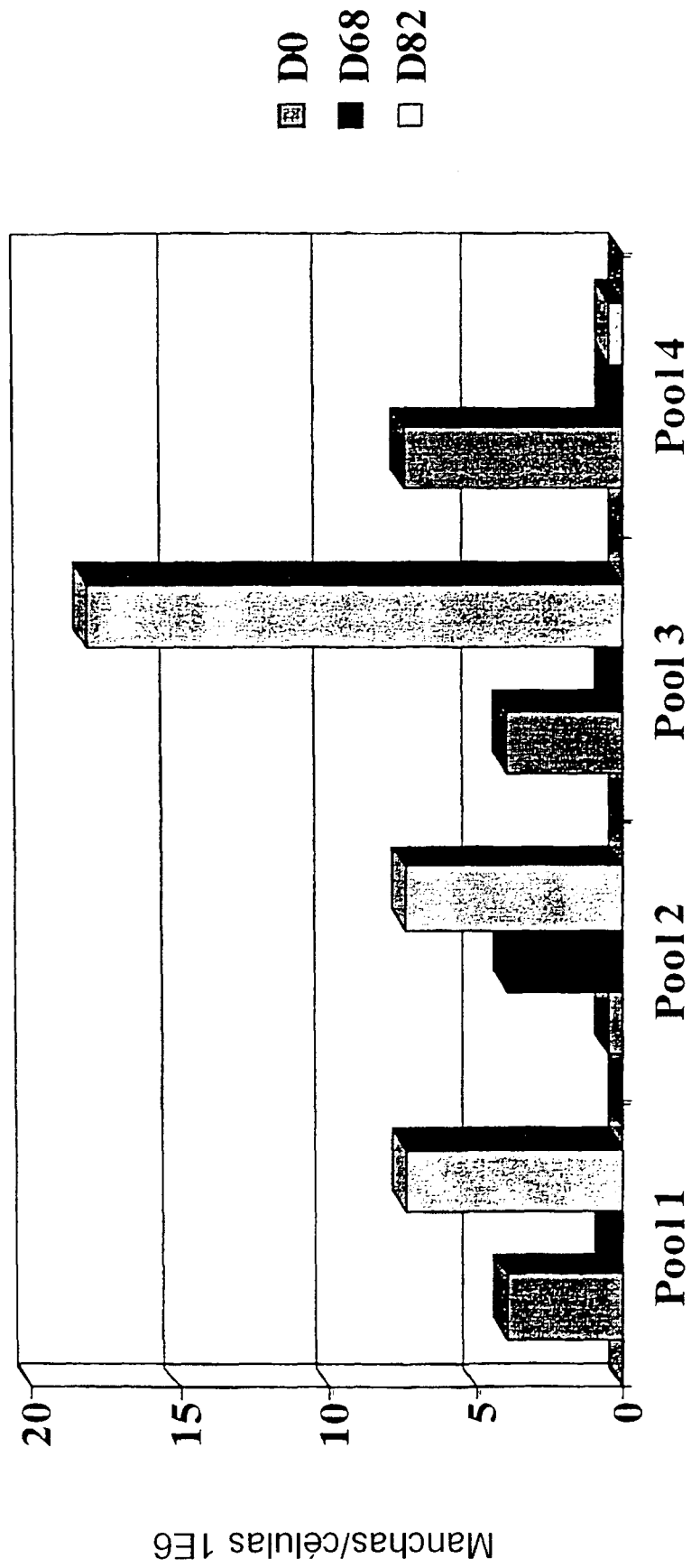


FIGURA 5

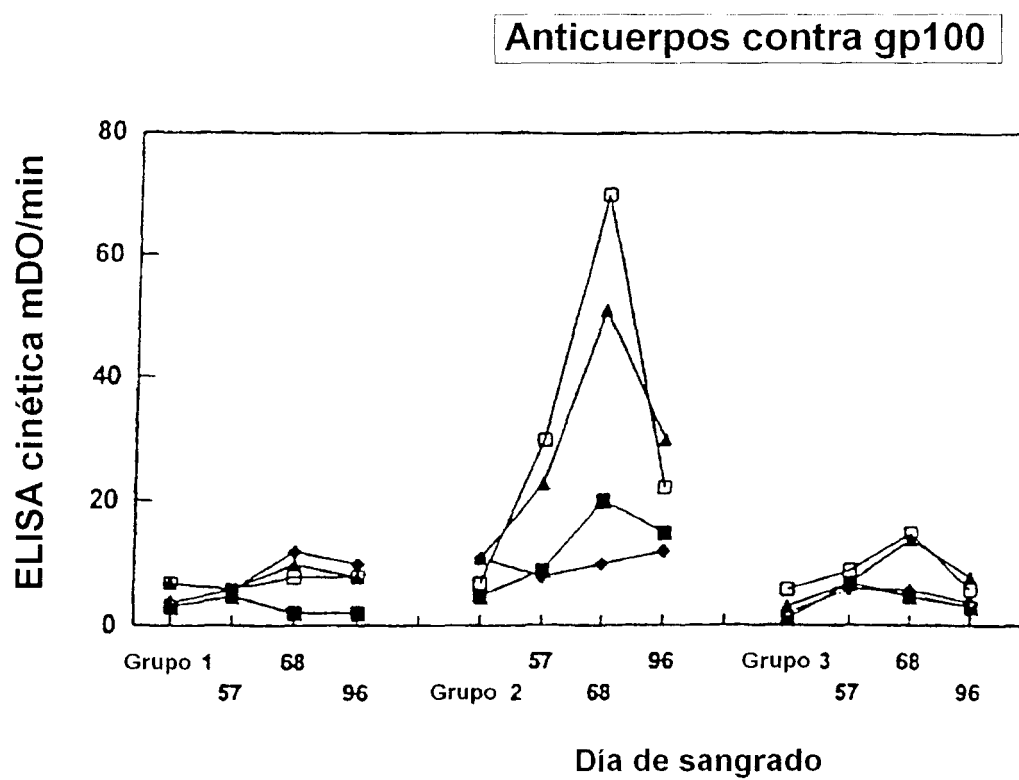


FIGURA 6

	ATGG	ATCTGGTGCT	AAAAAGATGC	CTTCTTCATT	TGGCTGTGAT
AGGTGCTTTG	CTGGCTGTGG	GGGCTACAAA	AGTACCCAGA	AACCAGGACT	GGCTTGGTGT
CTCAAGGCAA	CTCAGAACCA	AAGCCTGGAA	CAGGCAGCTG	TATCCAGAGT	GGACAGAAGC
CCAGAGACTT	GACTGCTGGA	GAGGTGGTCA	AGTGTCCCTC	AAGGTCAGTA	ATGATGGGCC
TACACTGATT	GGTGCAAATG	CCTCCTTCTC	TATTGCCTTG	AACTTCCCTG	GAAGCCAAAA
GGTATTGCCA	GATGGGCAGG	TTATCTGGGT	CAACAATACC	ATCATCAATG	GGAGCCAGGT
GTGGGGAGGA	CAGCCAGTGT	ATCCCCAGGA	AACTGACGAT	GCCTGCATCT	TCCCTGATGG
TGGACCTTGC	CCATCTGGCT	CTTGGTCTCA	GAAGAGAAGC	TTTGTTTATG	TCTGGAAGAC
CTGGGGCCAA	TACTGGCAAG	TTCTAGGGGG	CCCAGTGTCT	GGGCTGAGCA	TTGGGACAGG
CAGGGCAATG	CTGGGCACAC	ACACGATGGA	AGTGACTGTC	TACCATCGCC	GGGGATCCCC
GAGCTATGTG	CCTCTTGCTC	ATTCCAGCTC	AGCCTTCACC	ATTATGGACC	AGGTGCCTTT
CTCCGTGAGC	GTGTCCCAGT	TGCGGGCCCT	GGATGGAGGG	AACAAGCACT	TCCTGAGAAA
TCAGCCTCTG	ACCTTTGCCC	TCCAGCTCCA	TGACCCCAGT	GGCTATCTGG	CTGAAGCTGA
CCTCTCCTAC	ACCTGGGACT	TTGGAGACAG	TAGTGGAACC	CTGATCTCTC	GGGCACTTGT
GGTCACTCAT	ACTTACCTGG	AGCCTGGCCC	AGTCACTGTT	CAGGTGGTCC	TGCAGGCTGC
CATTCCCTCTC	ACCTCCTGTG	GCTCCTCCCC	AGTTCCAGGC	ACCACAGATG	GGCACAGGCC
AACTGCAGAG	GCCCCAACA	CCACAGCTGG	CCAAGTGCCT	ACTACAGAAG	TTGTGGGTAC
TACACCTGGT	CAGGCGCCAA	CTGCAGAGCC	CTCTGGAACC	ACATCTGTGC	AGGTGCCAAC
CACTGAAGTC	ATAAGCACTG	CACCTGTGCA	GATGCCAACT	GCAGAGAGCA	CAGGTATGAC
ACCTGAGAAG	GTGCCAGTTT	CAGAGGTCAT	GGGTACCACA	CTGGCAGAGA	TGTCAACTCC
AGAGGCTACA	GGTATGACAC	CTGCAGAGGT	ATCAATTGTG	GTGCTTTCTG	GAACCACAGC
TGCACAGGTA	ACAACCTACAG	AGTGGGTGGA	GACCACAGCT	AGAGAGCTAC	CTATCCCTGA
GCCTGAAGGT	CCAGATGCCA	GCTCAATCAT	GTCTACGGAA	AGTATTACAG	GTTCCCTGGG
CCCCCTGCTG	GATGGTACAG	CCACCTTAAG	GCTGGTGAAG	AGACAAGTCC	CCCTGGATTG
TGTTCTGTAT	CGATATGGTT	CCTTTTCCGT	CACCCTGGAC	ATTGTCCAGG	GTATTGAAAG
TGCCGAGATC	CTGCAGGCTG	TGCCGTCCGG	TGAGGGGGAT	GCATTTGAGC	TGACTGTGTC
CTGCCAAGGC	GGGCTGCCCC	AGGAAGCCTG	CATGGAGATC	TCATCGCCAG	GGTGCCAGCC
CCCTGCCCCAG	CGGCTGTGCC	AGCCTGTGCT	ACCCAGCCCC	GCCTGCCAGC	TGGTTCTGCA
CCAGATACTG	AAGGGTGGCT	CGGGGACATA	CTGCCTCAAT	GTGTCTCTGG	CTGATACCAA
CAGCCTGGCA	GTGGTCAGCA	CCCAGCTTAT	CATGCCTGGT	CAAGAAGCAG	GCCTTGGGCA
GGTTCCCGCTG	ATCGTGGGCA	TCTTGCTGGT	GTTGATGGCT	GTGGTCCTTG	CATCTCTGAT
ATATAGGCGC	AGACTTATGA	AGCAAGACTT	CTCCGTACCC	CAGTTGCCAC	ATAGCAGCAG
TCACTGGCTG	CGTCTACCCC	GCATCTTCTG	CTCTTGTCCC	ATTGGTGAGA	ACAGCCCCCT
CCTCAGTGGG	CAGCAGGTCT	GA			

FIGURA 7

Met	Asp	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Cys	Leu	Leu	His	Leu	Ala	Val	Ile	Gly
1				5					10					15	
Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Lys	Val	Pro	Arg	Asn	Gln	Asp	Trp
			20					25					30		
Leu	Gly	Val	Ser	Arg	Gln	Leu	Arg	Thr	Lys	Ala	Trp	Asn	Arg	Gln	Leu
		35					40					45			
Tyr	Pro	Glu	Trp	Thr	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Asp	Cys	Trp	Arg	Gly	Gly
	50					55					60				
Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Asn	Asp	Gly	Pro	Thr	Leu	Ile	Gly	Ala
65					70					75					80
Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Ile	Ala	Leu	Asn	Phe	Pro	Gly	Ser	Gln	Lys	Val
			85						90					95	
Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Trp	Val	Asn	Asn	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly
			100					105					110		
Ser	Gln	Val	Trp	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Tyr	Pro	Gln	Glu	Thr	Asp	Asp
		115					120					125			
Ala	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Gly	Gly	Pro	Cys	Pro	Ser	Gly	Ser	Trp	Ser
	130					135					140				
Gln	Lys	Arg	Ser	Phe	Val	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Trp	Gly	Gln	Tyr	Trp
145					150					155					160
Gln	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly	Arg
				165					170					175	
Ala	Met	Leu	Gly	Thr	His	Thr	Met	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	His	Arg	Arg
			180					185					190		
Gly	Ser	Arg	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ala	His	Ser	Ser	Ser	Ala	Phe	Thr
		195					200					205			
Ile	Met	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ala
	210					215					220				
Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Lys	His	Phe	Leu	Arg	Asn	Gln	Pro	Leu	Thr	Phe
225					230					235					240
Ala	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Glu	Ala	Asp	Leu
				245					250					255	
Ser	Tyr	Thr	Trp	Asp	Phe	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Arg
			260					265					270		
Ala	Leu	Val	Val	Thr	His	Thr	Tyr	Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Val
		275					280					285			
Gln	Val	Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Thr	Ser	Cys	Gly	Ser	Ser
	290					295					300				
Pro	Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asp	Gly	His	Arg	Pro	Thr	Ala	Glu	Ala	Pro
305					310					315					320
Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Gln	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Thr	Thr
				325					330					335	
Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Thr	Ala	Glu	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Gln
			340				345					350			
Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Met	Pro	Thr
		355					360					365			

FIGURA 7 (CONT.)

Ala	Glu	Ser	Thr	Gly	Met	Thr	Pro	Glu	Lys	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Val
370						375					380				
Met	Gly	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Met	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Thr	Gly	Met
385					390					395					400
Thr	Pro	Ala	Glu	Val	Ser	Ile	Val	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala
				405					410					415	
Gln	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Trp	Val	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Glu	Leu	Pro
			420					425					430		
Ile	Pro	Glu	Pro	Glu	Gly	Pro	Asp	Ala	Ser	Ser	Ile	Met	Ser	Thr	Glu
		435				440						445			
Ser	Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				
Arg	Leu	Val	Lys	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Asp	Cys	Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr
465					470					475					480
Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Val	Gln	Gly	Ile	Glu	Ser	Ala
				485					490					495	
Glu	Ile	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Phe	Glu	Leu
			500					505					510		
Thr	Val	Ser	Cys	Gln	Gly	Gly	Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Cys	Met	Glu	Ile
		515					520					525			
Ser	Ser	Pro	Gly	Cys	Gln	Pro	Pro	Ala	Gln	Arg	Leu	Cys	Gln	Pro	Val
	530					535					540				
Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Cys	Gln	Leu	Val	Leu	His	Gln	Ile	Leu	Lys	Gly
545					550					555					560
Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Cys	Leu	Asn	Val	Ser	Leu	Ala	Asp	Thr	Asn	Ser
				565					570					575	
Leu	Ala	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Ile	Met	Pro	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly
			580					585					590		
Leu	Gly	Gln	Val	Pro	Leu	Ile	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Ala
	595					600						605			
Val	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile	Tyr	Arg	Arg	Arg	Leu	Met	Lys	Gln	Asp
	610					615					620				
Phe	Ser	Val	Pro	Gln	Leu	Pro	His	Ser	Ser	Ser	His	Trp	Leu	Arg	Leu
625					630					635					640
Pro	Arg	Ile	Phe	Cys	Ser	Cys	Pro	Ile	Gly	Glu	Asn	Ser	Pro	Leu	Leu
				645					650					655	
Ser	Gly	Gln	Gln	Val											
			660												

FIGURA 8

```

ATGGAGTCTCCCTCGGCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCGGCAGAGGCTCCTGCTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACCTCAGAGGGAGCCGGGAGGGGTGTCTACCACGTAGGGGACCGTCTCCGAGGACGAG

M E S P S A P P H R W C I P W Q R L L L -

ACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACTGCCAAGCTCACTATTGAATCC
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGTCGGAGTGAAGATTGGAAGACCTTGGGCGGGTGGTGACGGTTCGAGTGATAACTTAGG

T A S L L T F W N P P T T A K L T I E S -

ACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
TGCGGCAAGTTACAGCGTCTCCCCCTCCTCCACGAAGATGAACAGGTGTTAGACGGGGTC

T P F N V A E G K E V L L L V H N L P Q -

CATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATA
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
GTAGAAAAACCGATGTCGACCATGTTTCCACTTTCTCACCTACCGTTGGCAGTTTAATAT

H L F G Y S W Y K G E R V D G N R Q I I -

GGATATGTAATAGGAAGTCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATACAGTGGTCGAGAGATA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTATACATTATCCTTGAGTTGTTTCGATGGGGTCCCGGGCGTATGTCACCAAGCTCTCTAT

G Y V I G T Q Q A T P G P A Y S G R E I -

ATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAATCATCCAGAATGACACAGGATTCTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
TATATGGGGTTACGTAGGGACGACTAGGTCTTGTAGTAGGTCTTACTGTGTCCTAAGATG

I Y P N A S L L I Q N I I Q N D T G F Y -

ACCCTACAGCTCATAAAGTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTA
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGGGATGTGCAGTATTTAGTCTAGAACACTTACTTCTTCGTTGACCGGTCAAGGCCCAT

T L H V I K S D L V N E E A T G Q F R V -

TACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACACTCCAAACCCGTGGAGGACAAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
ATGGGCCCTCGACGGGTTTCGGGAGGTAGAGGTGCGTTGTTGAGGTTTGGGCACCTCCTGTTC

Y P E L P K P S I S S N N S K P V E D K -

GATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTA
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTACGACACCGGAAGTGGACACTTGGACTCTGAGTCCTGCGTTGGATGGACACCACCCAT

D A V A F T C E P E T Q D A T Y L W W V -

AACAATCAGAGCCTCCCGGTCACTCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCCTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
TTGTTAGTCTCGGAGGGCCAGTCAGGCTCCGACGTCGACAGGTTACCGTTGTCCTGGGAG

N N Q S L P V S P R L Q L S N G N R T L -

ACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCA
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
TGAGATAAGTTACAGTGTTCTTTACTGTGTCGTTTCGATGTTTACACTTTGGGTCTTGGGT

T L F N V T R N D T A S Y K C E T Q N P -

GTGAGTGCCAGGCGCAGTGATTCACTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCCCGGATGCCCCC
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
CACTCACGGTCCGCGTCACTAAGTCAGTAGGACTTACAGGAGATACCGGGCTACGGGGG

V S A R R S D S V I L N V L Y G P D A P -

```

FIGURA 8 (CONT.)

```

ACCATTTCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCAC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
TGGTAAAGGGGAGATTGTGTAGAATGTCTAGTCCCTTTTAGACTTGGAGAGGACGGTG

T I S P L N T S Y R S G E N L N L S C H -

GCAGCCTCTAACCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
CGTCGGAGATTGGGTGGACGTGTCATGAGAACCAAACAGTTACCTGAAAGGTCGTTAGG

A A S N P P A Q Y S W F V N G T F Q Q S -

ACCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCCAA
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
TGGGTTCCTCGAGAAATAGGGGTGTAGTGACACTTATTATCACCTAGGATATGCACGGTT

T Q E L F I P N I T V N N S G S Y T C Q -

GCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGACGATCAGTCTATGAG
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
CGGGTATTGAGTCTGTGACCGGAGTTATCCTGGTGTGCTGCTAGTGTGAGATACTC

A H N S D T G L N R T T V T T I T V Y E -

CCACCCAAACCTTCATCACCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGATGAGGATGCTGTA
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
GGTGGGTTTGGGAAGTAGTGGTCGTTGTTGAGGTTGGGGCACCTCCTACTCCTACGACAT

P P K P F I T S N N S N P V E D E D A V -

GCCTTAACCTGTGAACCTGAGATTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATAATCAG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGGAATTGGACACTTGGACTCTAAGTCTTGTGTTGGATGGACACCCCATTTATTAGTC

A L T C E P E I Q N T T Y L W W V N N Q -

AGCCTCCCGGTGAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGACCTCACTCTACTC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TCGGAGGGCCAGTCAGGGTCCGACGTCGACAGGTTACTGTTGCTCCTGGGAGTGAGATGAG

S L P V S P R L Q L S N D N R T L T L L -

AGTGTACACAAGGAATGATGTAGGACCCTATGAGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
TCACAGTGTTCCTTACTACATCCTGGGATACTCACACCTTAGGTCTTGCTTAATTCACAA

S V T R N D V G P Y E C G I Q N E L S V -

GACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCTCTATGGCCCAGACGACCCACCATTTCC
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTGGTGTGCTGGGTGAGTAGGACTTACAGGAGATACCGGGTCTGCTGGGGTGGTAAAGG

D H S D P V I L N V L Y G P D D P T I S -

CCCTCATACACCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCT
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
GGGAGTATGTGGATAATGGCAGGTCCCACCTTGGAGTCGGAGAGGACGGTACGTCGGAGA

P S Y T Y Y R P G V N L S L S C H A A S -

AACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TTGGGTGGACGTGTCATAAGAACCGACTAACTACCCTTGTAGGTCGTTGTGTGTGTTCTC

N P P A Q Y S W L I D G N I Q Q H T Q E -

CTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAAGCAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAAC
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GAGAAATAGAGGTTGTAGTGACTCTTCTTGTGCGCTGAGATATGGACGGTCCGGTTATTG

L F I S N I T E K N S G L Y T C Q A N N -

```

FIGURA 8 (CONT.)

```

TCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCC
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
AGTCGGTCACCGGTGTCGTCCTGATGTCAGTTCTGTTAGTGTGAGAGACGCCTCGACGGG

S A S G H S R T T V K T I T V S A E L P -

AAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TTCGGGAGGTAGAGGTCGTTGTTGAGGTTTGGGCACCTCCTGTTCTACGACACCGGAAG

K P S I S S N N S K P V E D K D A V A F -

ACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TGGACACTTGGACTCCGAGTCTTGTGTTGGATGGACACCACCCATTTACCAGTCTCGGAG

T C E P E A Q N T T Y L W W V N G Q S L -

CCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTC
1621 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
GGTCAGTCAGGTCGACGCTCGACAGGTTACCGTTGTCTGGGAGTGAGATAAGTTACAG

P V S P R L Q L S N G N R T L T L F N V -

ACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGC
1681 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
TGTTCTTTACTGCGTTCTCGGATACATACACCTTAGGTCTTGAGTCACTCACGTTTGGCG

T R N D A R A Y V C G I Q N S V S A N R -

AGTGACCCAGTCACCCCTGGATGTCCTCTATGGGCGGACACCCCATCATTTCCCCCCA
1741 -----+-----+-----+-----+-----+ 1800
TCACTGGGTGAGTGGGACCTACAGGAGATACCCGGCCTGTGGGGGTAGTAAAGGGGGGT

S D P V T L D V L Y G P D T P I I S P P -

GACTCGTCTTACCTTTTCGGGAGCGGACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860
CTGAGCAGAATGGAAAGCCCTCGCCTGGAGTTGGAGAGGACGGTGAGCCGGAGATTGGGT

D S S Y L S G A D L N L S C H S A S N P -

TCCCCGCAGTATCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
AGGGGCGTCATAAGAACCGCATAGTTACCCTATGGCGTCGTTGTGTGTGTTCAAGAGAAA

S P Q Y S W R I N G I P Q Q H T Q V L F -

ATCGCCAAAATCAGCCAAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTGTCTCTAACTTGGCT
1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
TAGCGGTTTTAGTGCGGTTTATTATTGCCCTGGATACGGACAAAACAGAGATTGAACCGA

I A K I T P N N N G T Y A C F V S N L A -

ACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCTTCTCCT
1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
TGACCGGCGTTATTAAGGTATCAGTTCTCGTAGTGTGAGAGACGTAGACCTTGAAGAGGA

T G R N N S I V K S I T V S A S G T S P -

GGTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTGCGGCATCATGATTGGAGTGTGTTGGGGTGTCTCTG
2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
CCAGAGAGTCGACCCCGGTGACAGCCGTAGTACTAACCTCACGACCAACCCCAACGAGAC

G L S A G A T V G I M I G V L V G V A L -

ATATAG ←
2101 ----- 2106
TATATC

I * ←

```